

Zentralblatt
für
Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten

Begründet von Oskar Uhlworm

Zweite Abteilung:

Allgemeine, landwirtschaftliche, technische, Nahrungsmittel-Bakteriologie und Mykologie (einschließlich der Gärungsphysiologie und Enzymologie), Protozoologie, Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz, sowie Tierkrankheiten (ausschließlich der in das Gebiet der Medizin gehörenden)

herausgegeben von

Oberregierungsrat Dr. C. Stapp
Berlin-Dahlem, Königin-Luise-Str. 17/19

94. Band

Mit 93 Abbildungen im Text



Jena
Verlag von Gustav Fischer
1936

Zentralblatt für Bakt. etc. II. Abt. Bd. 94. No. 1/4
Ausgegeben am 3. April 1936.

Studien über Kokken[1]).

[Aus dem Bakteriologischen Institut der Preußischen Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft in Kiel.
Direktor: Prof. Dr. W. Henneberg †.]

Von **Karl-Heinz Meewes.**

Mit 12 Abbildungen im Text.

I. Einleitung.

Zu einer Zeit, in der das Problem des Bakterienpleomorphismus in den Mittelpunkt des Interesses bakteriologischer Forschung gerückt ist, erschien es am Platze, in einer neuerlichen Arbeit über Kokken die Untersuchungen hauptsächlich nach diesen Gesichtspunkten hin anzustellen.

So verhältnismäßig häufig in der Literatur der letzten Jahre von der Umwandlung von stäbchenförmigen Bakterien in Kokken und kokkenähnliche Gebilde berichtet wird, so selten sind die Ergebnisse von Forschungen, die das umgekehrte Ziel vor Augen hatten, nämlich Kokken in andere Mikrobenformen überzuführen.

Über die bisherigen Forschungen und Erkenntnisse auf diesem Gebiete läßt sich folgendes anführen:

Bereits 1900 berichtete Matzuschita, daß in der Kultur von Sarcina lutea und agilis auf 10,5 proz. Kochsalzagar vereinzelte langgestreckte Formen auftraten. Lohnis und Smith stellten 1916 bei Planosarcina ureae Beij. Neigung zum Übergang in kurze und lange Stabchen fest.

Erst 1930 erschien eine Arbeit von Schmidt-Kehl, in der systematisch der Formenwechsel bei Sarzinen untersucht wurde. Es wurde bei Sarc. lutea und agilis ein Übergang von grampositiven Sarzinen in gramnegative Stabchen, sowie deren Ruckverwandlung in Sarzinen, beobachtet. Schmidt-Kehl arbeitete sowohl mit üblichen Reinkulturen als auch mit solchen, die aus einer Einzellkultur hervorgegangen waren.

In der Zusammenfassung seiner Arbeit gibt er weiter an: „Die Änderung der Form kam auf festen und flussigen Nährboden zustande und trat bei Einwirkung von Lithiumchlorid rascher, ohne diesen Reiz langsamer ein; sie erfolgte sprunghaft ohne Übergänge. Von den gramnegativen Stäbchen wurden Einzellkulturen angelegt, in den aus ihnen stammenden Kulturen erfolgte ohne besondere Reize die Rückverwandlung in Sarzinen mit allen Eigenschaften der Ausgangsform."

Im Jahre 1931 erschien eine Dissertation uber „Pleomorphismus bei Sarcina flava" von Klimmek. Dieser Autor beobachtete Sarc. flava in fixierten Färbepräparaten. Dabei stellte er die verschiedensten Zellformen fest: winzigste Stäbchen, Keulenformen mit kernähnlichen Körnchen, Siegelringformen, nach Much färbbare Kornchen, amöboide Gebilde und mehrmals größere Stabformen. Durch LiCl-Zusatz konnte er keine Formenvermehrung erzielen.

In einer Arbeit über Gärungssarzinen gibt J. Smit an, daß er bei Behandlung von Zymosarcina ventriculi mit LiCl nicht, wie Schmidt-Kehl, andere Formen finden konnte. Er sah lediglich, daß die Sarzine „auf diesen Eingriff

[1]) Erschienen als Dissertation der Philosophischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität Kiel.

Tabelle 1.

Stamm Nr.	Anordnung der Zellen	Mittlere Zellgröße in µ	Gramfärbung	Bouillonagar-Kolonie	Fundort	Wachstum auf Kartoffeln	Milchagarplatten Kaseïn-abbau	Milchagarplatten Wachstum
1	Sarzinen	2,1	+	grüngelb, gelb werdend	Labor.-Luft	maßig	+ 3 Tg.	
2	Einzel- und Diplok.	0,8	+	rosa glänzend, glatt	Vorgarten-Luft	fehlt	+ einige Tg.	
3	Trauben	0,9	+	gelborange, mattglänzend	Luft, Zahnklinik	gut	++	
4	Einzelk.	0,8	+	weißlich	Kuhkot	gut	++	sehr kräftig
5	Diplok.	2,1	+	gelb-bräunlich	Laborator.-Luft	,,	—	mäßig
6	Tetraden	1,1	+	blaßgelb	Wasser (Kleiner Kiel)	fehlt	+	
7	Trauben	0,85	+	glänzendweiß	Luft, Zahnklin.	mäßig	—	mäßig
8	Trauben	0,85	+	gelblichweiß	Luft	fehlt	(+)	,,
9	Einzel- und Diplok.	0,9	+	schmutzigweiß	Pferdekot	gut, gelblich	—	gelblich
10	Sarzinen	0,85	+	dunkelgelb	Luft	fehlt	—	mäßig
11	Sarzinen	1,8	+	gelblich, große gelappte Kol.	Labor.-Luft	gut, grauweiß	—	trocken
12	Einzelk.	1,4	+	bräunlich	Rohmilch	gut, gelb	+	festhaft. Kol.
13	Diplok.	0,8	+	farblos	Luft	sehr mäßig	(+)	zitronengelb
14	Sarzinen	0,9	+	grünlich-gelb	Augensekret	mäßig, durchscheinend	—	
15	Trauben	1,0	+	gelblich-weiß	Urethritiseiter	gut, grauweiß	—	weiß
16	Trauben	0,95	+	gelblich-grau	Furunkel	gut	—	gelb
17	Einzelk.	1,2	+	weißlich	Luft	gut, graugelb	—	
18	Einzelk.	0,75	+	weiß, mattglänzend, flach	,,	weißlich	—	
19	Einzelk.	0,9	+	weiß, gelblich werdend	Labor.-Luft	mäßig	—	
20	Einzelk.	0,8	+	weißlich	Pferdekot	,,	(+) 7 Tage	etwas fadenziehd., kraus fest a. Agaroberfläche
21	Diplok.	0,8	+	,,	Strandsand auf Grönland	gut, gelblich	—	
22	Einzelk.	1,2	+	hellgelb	Kuhjauche	mäßig	+	
23	Diplok. (Molekul.-Bew.)	1,35	+	glänzend weiß, flach	Luft	schwach	—	
24	Trauben	1,35	+	hellgelb	,,	fehlt	—	
25	Tetraden (Molek.-B.)	1,2	+	weißlich	Moor (Grönland)	,,	—	grünlich-gel
26	Tetraden	1,1	+	hellbraun	Kuhkot	mäßig	—	
27	Sarzinen	1,2	+	gelb	Luft	fehlt	+	mäßi
28	Trauben	1,2	+	hellgelb	,,	sehr mäßig	—	
29	Tetraden	1,2	+	hell grünlich-gelb, saftig, glänzend	Pferdekot	mäßig	—	

Tabelle 1.

Säuerung + Alkalibildung — aus Laktose	Säuerung + Alkalibildung — aus Dextrose	Gasbildung aus Laktose, Dextrose	Gelatinestich (Verflüssig. = +) (1—40 Tage)	Magermilchkoagulation	Fettspaltung (Vollmilchfederstrich)	Nitratreduktion	Indolbildung	Lackmusmilch (+ = Säuerung, — = Alkalibild.)	Blutagarplatte (Hämolyse = +)	Identisch bzw. verwandt mit (nach L et N u. Bergey [= B])
+	+	—	+ nach mehreren Tagen	— peptonisiert n. 5—6 Tg.	sehr gering	—	—	0	+ nach 7 Tagen	Sarcina lutea
—	(—)	—	— tief ausgebauchte Dellenbildung	— peptonisiert n. 30 Tg.	—	+	—	(+)	—	Microc. roseus
0	(+)	—	+ nach mehreren Tagen	— pepton.	—	—	—	0 pept.	+ nach mehr. Tg.	Micro. pyg. α aur., Kl. IV, Martha Bays
—	+	—	+	+ pept.	—	+	—	(+)	—	Micr. flavus
—	+	—	—	—	gering	+	—	0	—	Micr. luteus
—	—	—	+ langsam	—	—	—	—	0	—	Micr. flavus
0	+	—	+ sehr langsam	—	—	+	—	0	—	Micr. pyog. γ albus, Kl. III, M. Bays
—	—	—	+ langsam	—	—	—	—	0	—	Micr. pyog. γ albus, Kl. IV, M. Bays
r	+	—	— Dellenbildung	—	—	+	—	+	+ nach 7 Tagen	Micr. rosettaceus
—	—	—	+	—	—	—	—	0	—	Sarcina subflava (B)
—	+	—	+ sehr langsam	—	—	+	—	0	—	Sarcina flava (B)
(+)	+	—	+	— pept.	—	+	—	+	—	Micr. pyog. α aur./citreus
+	+	—	+ sehr langsam	+	—	+	—	0	—	Micr. flavus
0	0	—	+ sehr langsam	—	gering	—	—	0	+ nach 7 Tagen	Sarc. subflava (B)
+	+	—	—	—	,,	+	—	(+)	+	Staph. citreus/albus Migula (B)
0	+	—	+	+	—	+	—	(—)	+	Staph. citr. Mig. (B)
(+)	+	—	+ langsam	—	—	+	—	0	+	Micr. coronatus
(+)	+	—	+ langsam	—	—	+	—	(+)		Micr. candic. Winsl.
—	0	—	—	—	—	—	—	0		Micr. candicans Flugge
—	+	—	+ langsam	—	—	—	—	(+)		Micr. pyog. albus
—	+	—	— Dellenbildung	—	—	(+)	—	+		Micr. rosettaceus
(+)	+	—	+ sehr langsam	+ pept.	—	—	—	(+)		Micr. luteus
—	+	—	—	—	gering	—	—	0		Micr. candic. Flugge
—	—	—	+ sehr langsam	—	—	—	—	0		Micr. luteus
(+)	+	—	— tiefe Dellenbildung	—	—	+	—	(+) pept.		Micr. rosettaceus
+	+	—	+	—	—	—	—	+		Micr. aurantiacus, Kl. II, M. Bays
—	0	—	+ langsam				—	—		Sarc. subfl./flav.(B)
(+)	+	—	—							Micr. sulfureus Z, erw. L et N
—	—	—	+ langsam					)		Micr. luteus

Tabelle 1

Stamm Nr.	Anordnung der Zellen	Mittlere Zellgröße in μ	Gramfärbung	Bouillonagar-Kolonie	Fundort	Wachstum auf Kartoffeln	Milchagarplatten	
							Kaseinabbau	Wachstum
30	Tetraden	1,3	+	hellgelb, flach	Pferdekot	fehlt	(+)	
31	Diplok. (Molekul.-Bew.)	1,3	+	gelblich	Luft	gut	—	bräunlich
32	Tetraden	0,85 –1,0	+	hell grunlich-gelb, flach	Wasser (Kleiner Kiel)	fehlt	(+)	
33	Sarzinen	1,4	+	hellgelb	Wasser (Kleiner Kiel)	sehr kräftig, zitronengelb	+	
34	Trauben	0,75	+	farblos	Augensekret	maßig	+	weißlich
35	Trauben	0,9	+	gelblich	Urethritiseiter	gut	—	weiß
36	Diplok.	0,75	+	gelblich-weiß	Furunkel	durchscheinend, weißl.	—	sehr gering

nur die allmähliche Bildung einer gewissen Zahl Einzelkokken" reagierte. Dagegen kommt er auf Grund seiner Untersuchungen zu der Ansicht, daß Zymosarcina ventriculi eine latente unfiltrierbare Naturform haben muß. Diese sei bis jetzt unsichtbar, gegen Aufbewahren und Erhitzen sowie gegen Chemikalien sehr widerstandsfähig; sie sei aber imstande, unter geeigneten Umständen auf irreversible Weise in die bekannte Warenballenform uberzugehen.

Helmut Schmidt gibt in einer 1933 erschienenen Arbeit an, bei der Nachprüfung der Schmidt-Kohlschen Ergebnisse ebenfalls Umwandlung von Sarzinen in Stäbchen beobachtet zu haben. In seiner Zusammenfassung heißt es: „Bei 4 von 13 Stämmen wurde ... entsprechend den Angaben von Schmidt-Kohl unter dem Einfluß von Lithiumsalzen ein deutlicher Formenkreislauf beobachtet, der im Laufe von Wochen von Sarzinen zu gramfreien beweglichen Stäbchen und wieder zurück zu Sarzinen führt. Als Übergangsformen wurden dabei Stäbchen mit Langsteilung gefunden." Die Untersuchungen von Helmut Schmidt aber ergaben, daß die Umwandlungszeiten bedeutend kürzer bei ihm waren als bei Schmidt-Kehl. Während Schmidt-Kehl die Ausbildung von Stabchen bei Vorbehandlung mit LiCl nach 6 Monaten feststellen konnte und ohne diese Behandlung erst nach 1½ Jahren, fand H. Schmidt seine Umwandlungen bereits nach einer Woche bzw. 4 Wochen.

Von den zitierten Arbeiten interessierten im Rahmen vorliegender Studien besonders die Untersuchungen von Schmidt-Kehl und H. Schmidt, da es nach ihren Angaben gelungen ist, rein kugelförmige Bakterien, nämlich Sarzinen (im Gegensatz zu den eiförmigen lactis-Formen) in Stäbchen zu verwandeln.

Diese Ergebnisse sollten einer Nachprüfung unterzogen werden und, falls sie sich bestätigen ließen, sollte untersucht werden, ob nicht nur Sarzinen, sondern auch andere kugelförmige Bakterienarten in andere Formen, speziell Stäbchen, umzuzüchten sind.

Es wurden 36 Sarzinen-, Tetrakokken- und Mikrokokkenstämme aus Luft, Milch, Jauche, Kuh- und Pferdekot, Wasser, Furunkel- und Urethritiseiter sowie dem Sekret aus einem Auge isoliert. Nachdem die wichtigsten kulturellen, morphologischen und physiologischen Merkmale festgelegt waren (siehe Tab. 1), wurden die Umwandlungsversuche vorgenommen. Von sämtlichen Stämmen wurden auch Schrägagarkulturen hergestellt und mit Paraffin verschlossen aufbewahrt, um eventuelle Variationen, die sich erst im Laufe von Monaten ergeben könnten, feststellen zu können.

(Fortsetzung).

Säuerung + Alkalibildung — aus Laktose	Säuerung + Alkalibildung — aus Dextrose	Gasbildung aus Laktose, Dextrose	Gelatinestich (Verflüssig. = +) (1—40 Tage)	Magermilchkoagulation	Fettspaltung (Vollmilchfederstrich)	Nitratreduktion	Indolbildung	Lackmusmilch (+ = Säuerung, — = Alkalibild.)	Blutagarplatte (Hämolyse = +)	Identisch bzw. verwandt mit (nach L et N u. Bergey [= B])
—	—	—	+ langsam	—	—	—	—	0		Micr. luteus
(+)	+	—	—	—	—	+	—	+		Micr. sulfureus Zim. erw. v. L. et N
—	(+)	—	+ langsam	—	—	—	—	0		Micr. luteus
—	0	—	—	—	—	—	—	—		Sarc. flava
+	—	—	+	+ pept.	+	(+)	—	+ pept.		Staph. albus Rosenbach (B)
—	+	—	—	—	—	+	—	0		Micr. cereus albus Passet
+	—	—	—	—	+	+	—	+		Micr. pyog. γ albus

Bei der Isolierung wurden 6 Plattenpassagen vorgenommen in der Art, daß jedesmal etwas von einer einzeln liegenden Kolonie mit der Öse in mehreren Zickzacklinien auf einer anderen Platte ausgestrichen wurde. Eine Reinkultur im üblichen Sinne war somit gewährleistet, d. h. eine solche, bei der die Möglichkeit des Vorhandenseins ultravisibler Mikroorganismen zugegeben wird. Mit den so gewonnenen Reinkulturen wurden, wie aus dem folgenden hervorgeht, die mannigfachsten Variationsversuche angestellt. Vorweg sei hier bemerkt, daß es in keinem Falle gelang, aus Kugelbakterien Stäbchenbakterien zu züchten und somit die Ergebnisse von Schmidt-Kehl und H. Schmidt zu bestätigen. Dagegen wurden andere Erscheinungen festgestellt.

Bei den Variationsversuchen wurden die Kokken durch chemische oder physikalische Einwirkungen geschädigt bzw. einseitig, anormal ernährt, um sie zu Variationen zu veranlassen, ein Prinzip, das auch den bisher gelungenen Bakterienumzüchtungen zugrunde lag.

Die in vorliegenden Studien angewandte Methodik lehnte sich also an die anderer Autorén an, sei es, daß dieselben Methoden angewendet bzw. modifiziert wurden, oder eigene erprobt wurden.

II. Umwandlungsversuche.

A. Morphologische und kulturelle Befunde.

1. Behandlung mit Lithiumchlorid.

In der ersten Versuchsreihe wurden die Kokken einer LiCl-Behandlung ausgesetzt, wie es Schmidt-Kehl und H. Schmidt angaben. Die dabei angewandte Methodik war folgende:

Die betreffende Kultur wurde in 0,5—2,5 proz. LiCl-Bouillon oder -Agar geimpft und etwa 4—6 Wochen auf diesem Nährsubstrat gezüchtet. Darauf wurde auf gewöhnlichen Nähragar geimpft und die Kolonie beobachtet.

Die beiden genannten Autoren fanden nun nach längerer Zeit eine Saumbildung an den einzelnen Kolonien. Während Schmidt-Kehl eine solche erst nach 6—12 Monaten beobachtete, konnte H. Schmidt

sie bereits nach spätestens 4 Wochen (bei 4 von 15 Stämmen) feststellen. Dieser Saum bestand aus beweglichen Stäbchen. Es sei hier erwähnt, daß H. Schmidt diese Saumbildung auch bei einer nicht mit LiCl vorbehandelten Kultur gefunden hat, und zwar nach 10—12 Wochen, und daß Schmidt-Kehl einen ähnlichen Fall beobachtete, jedoch erst nach einem Zeitraum von 1½ Jahren. Dieser Unterschied in den „Umwandlungszeiten" der Sarzinen läßt natürlich den Verdacht an eine Infektion aufkommen. So ist bei Dauerkulturen z. B. auch die Gefahr des Auftretens von andere Keime verschleppenden Milben zu beachten. Die Milben fressen die Bakterienkolonien und hinterlassen gelegentlich, wie Abb. 4 zeigt, nur auf den Kolonien, sonst nirgends auf der Platte, die eingeschleppten Fremdkeime. Die von Schmidt-Kehl und H. Schmidt beschriebenen „wasserhellen", „durchsichtigen" „Höfe" und „Säume" rings um die Sarzinenkolonien mit beweglichen Stäbchen, konnten im Laufe vorliegender Untersuchungen mehrere Male als Infektion erkannt werden.

Aus der Reihe der angestellten Versuche mit LiCl-Vorbehandlung seien folgende Fälle erwähnt:

Ein Sarcina lutea-Stamm (St. 1), der 30 Min. auf 60—61° C erhitzt war, wurde der Einwirkung einer 3 proz. LiCl-Bouillon ausgesetzt und nach 17 Tagen auf eine Bouillonagarplatte geimpft. Nach 5 Monate langem Aufbewahren dieser Platte konnte festgestellt werden, daß die anfänglich gelbgrüne Koloniefarbe in eine mehr grau-gelbe Farbe umgeschlagen war. Auf frischen Nährboden gebracht, trat jedoch die ursprüngliche Farbe wieder auf. Die grau-gelben Kolonien zeigten kein abweichendes morphologisches Bild. In einem anderen Versuch waren 3 Monate nach der Lithiumbehandlung die gelben Kolonien am Rande etwas heller geworden; es handelte sich aber nicht um eine Saumbildung im Sinne der beiden genannten Autoren. Die Kolonien enthielten sehr kleine Sarzinen. Es handelte sich jedoch hierbei nur um eine „Hungerform", da auf neuem Nährboden wieder normal große Sarzinen wuchsen.

In einer weiteren Versuchsreihe, bei der 10 Sarzinen- und Kokkenstämme (1—7, 10, 11, 14) einer 35 tägigen Vorzüchtung in 1 proz. LiCl-Bouillon ausgesetzt waren, brachte lediglich ein Stamm, ein rosa Micrococcus (St. 2), einen auffälligen kulturellen Befund. Nachdem der Stamm 17 Tage auf der Agarplatte gewachsen war, traten rauhe, gerunzelte Kolonien neben den gewöhnlichen, glänzenden glatten auf, wie Abb. 2 wiedergibt. (Bei einer Abimpfung aus der 56 Tage alten LiCl-Kultur war die rauhe Form nicht wieder zu erlangen.) Das mikroskopische Bild der glatten Kolonieform ließ gleichmäßig geformte Einzelkokken erkennen. Dagegen boten die Organismen der rauhen Kolonie ein ganz anderes Bild. Die Kokken bildeten Tetraden. Außerdem befanden sich in der rauhen Kolonie Kokken verschiedener Größe. Sowohl die glatte wie rauhe Form konnten konstant, bei Abschluß dieser Arbeit bereits über 1 Jahr, fortgezüchtet werden. Näheres über diese beiden Formen bringt das Kapitel über R- und S-Formen (S. 18).

LiCl-Behandlung hat also

1. vorübergehende Änderung der Koloniefarbe bewirkt,
2. bei einer Sarzine vorübergehend eine „Hungerform" mit kleineren Zellen und Änderung der Koloniefarbe zu bilden vermocht,
3. in einem Falle eine R-Form hervorgebracht.

Behandlung mit Pepton und Harnstoff.

Sarc. lutea (St. 1) wurde in Bouillonröhrchen mit je 3% Pepton bzw. Harnstoff geimpft und nach einer Woche auf Dextroseagarplatten übertragen. Die Kolonien enthielten Tetraden, deren Kokken kleiner als die der Ausgangssarzine waren.

Der rosa gefärbte Micrococcus 2 war wie andere 25 Stämme (1—25) in 1 proz. Peptonwasser aufbewahrt und nach mehreren Monaten auf Platten ausgestrichen worden. Es stellte sich heraus, daß Micrococcus 2 nicht ausschließlich rosa gefärbte Kolonien hervorbrachte, sondern daneben auch weiße. Diese hatten gleiche Größe und gleiche Konsistenz wie die rosafarbenen. Auch das morphologische Bild und die physiologischen Eigenschaften beider Typen waren einheitlich. Die weiße Form erwies sich unter besonderen Maßregeln als konstant fortzüchtbar (näheres S. 17).

2. Erhitzungsversuche.

Um erprobte Bedingungen für eine morphologische Umwandlung herzustellen, wurden in einer zweiten ausgedehnten Versuchsreihe die Kokken einer Erhitzung unterworfen.

Diese Methode wurde von Kuhn angegeben und auch von Hüttig bei seiner Umzüchtung von Str. lactis in Bct. herbicola und umgekehrt angeblich mit Erfolg angewendet. Hierbei wurde eine Bouillon-Schrägagarkultur mit 5 ccm sterilem Leitungswasser aufgeschwemmt und im Röhrchen in einem Wasserbade bei bestimmten Temperaturen verschieden lange erhitzt, dann in zimmerwarmem Wasser abgekühlt. Eine kleine, mit Zunahme der Erhitzungsdauer größere Menge des Materials wurde jeweils mit einem Impfdrahtspatel auf Traubenzucker-Agarplatte verrieben und bebrütet.

Die hier beschriebenen Erhitzungsversuche stellen nur eine kleine Auswahl zahlreicher dar:

Stamm 1. Der Sarcina lutea-Stamm wurde jeweils 5, 10, 15, 20, 30, 45 Min. im Wasserbad erhitzt, bei 60—61° C gehalten und die Aufschwemmungen wie oben angegeben weiterbehandelt. Von den nach 30 und 45 Min. langem Erhitzen erhaltenen Kulturen ist folgendes zu vermerken: Die erstere wurde nach Anwachsen auf der Platte weiter in Bouillon geimpft und von der bebrüteten Bouillon auf Bouillon-Schrägagar. Hierbei stellte sich heraus, daß der Stamm auf der Agaroberfläche einen schleimigen Überzug, aus dem sich kleine Buckel erhoben, bildete.

Das mikroskopische Bild zeigte neben normalen Sarzinen unregelmäßige ovale Kokkenformen. Von dieser Kultur wurden weitere Platten hergestellt, um eventuelle Kolonien dieser unregelmäßigen Form zu isolieren. Es gelang aber nicht, solche Kolonien und die unregelmäßigen Kokkenformen wiederzufinden; die Kulturen wuchsen wieder normal.

Eine 45 Min. erhitzte Kultur von St. 1 zeigte, nachdem sie aus Schrägagar übertragen war, bedeutend kleinere Sarzinen und daneben einzelne Diploformen und Tetraden. Abimpfungen hiervon auf Bouillon- und Traubenzucker-Bouillonplatten ergaben dasselbe Bild. Nach einigen weiteren Übertragungen war jedoch wieder die ursprüng-Form festzustellen.

Eine ähnliche Erscheinung trat bei einem wiederholten Erhitzungsversuch mit St. 1 auf. Die Kultur war 50 Min. auf 60—61° C erhitzt worden

und brachte einige etwas hellere, bräunliche, aus kleinen Einzelkokken bestehende Kolonien hervor, die auf den üblichen Nährböden aber nicht wieder zum Anwachsen zu bringen waren.

In einem anderen Versuch wurde St. 1 auf 61—62° erhitzt:

Die Probe, die nach 25 Min. abgeimpft wurde, zeigte nicht die schönen zitronengelben, mattglänzenden Kolonien, sondern durchscheinend-gelbliche, sonst aber in der Zellform keinen Unterschied. Die nach 40 Min. genommene Probe brachte graue Kolonien hervor, die sich als Einzelkokken herausstellten. Diese ließen sich auf den üblichen Nährböden nicht wieder zum Anwachsen bringen.

Eine Kultur von Stamm 3, die 95 Min. auf 58° erhitzt und dann auf Schrägagar gebracht war, zeigte nach über einem Jahr eine einzelne rauhe Kolonie im Impfstrich. Die rauhe Kolonie erwies sich als konstant fortzüchtbar; die einzelnen Kokken zeigten keine morphologischen Abweichungen.

In einigen Versuchen wurden Erhitzung und NH_3-Behandlung vereinigt, wie weiter unten (S. 10) für einen Fall beschrieben wird.

In anderen wurden erhitzte Kulturen, nachdem sie wieder auf einem Schrägagarröhrchen angewachsen waren, abermals erhitzt und zuweilen noch ein drittes Mal, doch ohne Erfolg.

Die Erscheinung, daß erhitzte Kokkenstamme, obwohl sie zunächst anwuchsen, bisweilen nicht weiterwuchsen, konnte auch Hüttig bei manchen Str. lactis-Stammen feststellen. Wenn Hüttig Str. lactis in Stäbchen durch Erhitzung umzuwandeln vermochte, so darf dieses wohl darauf zurückzuführen sein, daß der Str. lactis kein Kokkus im eigentlichen Sinne ist. Seine typische Form ist die Eiform, die vielleicht mehr Verwandtschaft zu einem Stabchen als zu einem Kokkus haben mag.

Gelegentlich der Erhitzungsversuche konnten bezüglich der Hitzeresistenz der Kokken noch einige Beobachtungen gemacht werden: Stamm 3 ertrug Erhitzung auf 60° nicht 13 Min., dagegen auf 58° noch gut 120 Min. Diese letztere Kultur wurde abermals erhitzt und zeigte trotz großer Einsaat nach 120 Min. nur noch eine einzige Kolonie. Diese eine Kolonie wurde auf Schrägagar gebracht und ein drittes Mal auf 58° erhitzt. Der Stamm hielt einer 25 Min. langen Erhitzung nicht mehr stand. Kulturelle und morphologische Abweichungen konnten nicht gefunden werden.

Ähnliche Ergebnisse brachte die Erhitzung eines weißlich-grau wachsenden, aus Kuhkot stammenden Einzelkokkus (St. 4) und eines bräunlich wachsenden aus Luft isolierten Diplokokkus (St. 5). So zeigte: Stamm 4 nach einer 2 Std. langen Erhitzung auf 58° noch gutes Wachstum, die Schrägagarkultur hiervon, abermals 2 Std. erhitzt, nur wenige Kolonien. Bei der dritten Erhitzung wuchs schon nach über 40 Min. langer Erhitzung keine Kolonie mehr an.

Stamm 5: 58° 105 Min. gutes Wachstum; zweite Erhitzung 20 Min. kein Wachstum mehr.

Als Ergebnis der Erhitzungsversuche kann also folgendes festgestellt werden:

1. Vereinzeltes Auftreten unregelmäßiger Zellformen sowie Änderung der Koloniefarbe. Beide Erscheinungen verschwanden auf frischen Nährböden.
2. Ein erhitzter Stamm zeigte nach mehr als 1 jähr. Kultur eine vereinzelte rauhe Kolonie im Impfstrich, die sich als konstant fortzüchtbar erwies (R-Form).

3. Mehrfache Wiederholungen der Erhitzungen vermochten lediglich eine Abnahme der Hitzeresistenz hervorzurufen.

3. Behandlung mit Ammoniak.

Die folgende Versuchsreihe befaßte sich damit, die Kokken einer Ammoniakbehandlung zu unterziehen, wie es Kuhn und Sternberg mit den verschiedensten Stäbchenformen gemacht hatten, um die C-Formen, d. h. Kokkenformen, zu gewinnen. Die Versuchsanordnung war im einzelnen folgende:

Der betreffende Kokkus wurde in drei Reagenzröhrchen, die mit je 5 ccm Traubenzucker-Bouillon beschickt waren, geimpft und 3 Std. lang bei 30° bebrütet. Nach dem Bebrüten wurden die Röhrchen mit einer 9,9—10 proz. NH_3-Lösung, von der man die Verdünnungen 1 : 10, 1 : 100, 1 : 1000 hergestellt hatte, wie folgt behandelt:

Röhrchen 1 erhielt 0,15 ccm der NH_3-Lösung 1 : 10,
„ 2 „ 0,5 „ „ „ „ 1 : 100,
„ 3 „ 1,0 „ „ „ „ 1 : 1000.

Nach gründlichem Schütteln wurde die Kultur weitere 24 Std. bebrütet und dann daraus eine Öse auf einer Traubenzucker-Agarplatte ausgestrichen. Das Ausstreichen geschah entweder mit der Öse in Form von Zickzacklinien oder mit einem Impfdrahtspatel.

Von den zahlreichen nach dieser Methode ausgeführten Versuchen seien hier die mit den interessantesten Ergebnissen beschrieben:

Stamm 3. Nach erfolgter NH_3-Behandlung wurden am 1., 2., 3., 5., 6. Tage Ausstriche auf Traubenzucker-Agarplatten gemacht, ohne daß kulturell oder morphologisch etwas Auffallendes zu bemerken war. Erst auf der Platte, die 30 Tage nach der Behandlung ausgestrichen wurde (aus der NH_3-Lösung 1 : 10) traten neben normal aussehenden Kolonien unregelmäßig gebuckelte auf. Einige Kolonien hatten sich teilweise von der Agaroberfläche abgelöst und ihr freies Ende mehr oder weniger aufgerollt wie es Abb. 1 zeigt. Dieselbe Erscheinung konnte auf den Platten beobachtet werden, die nach weiteren 2 und 3 Tagen ausgestrichen wurden. Ein Ausstrich, der weitere 9 Tage später hergestellt wurde, ließ diese merkwürdige Kolonieform nicht mehr auftreten, und es ist auch später nicht gelungen, sie wieder zu erhalten. Abimpfungen von der Spur, die die aufgerollte Kolonie auf dem Agar hinterlassen hatte, wuchsen auf anderen Nährböden nicht an, die Aufrollungen selbst brachten wieder normale Kolonien hervor. Unter anderen Versuchsbedingungen, die weiter unten zu besprechen sind, konnte die aufgerollte Form wiedergefunden werden (S. 21). Das mikroskopische Bild zeigte bei dieser ganzen Versuchsreihe keine morphologischen Veränderungen gegenüber dem Ausgangsstamm.



Abb. 1. Micr. pyog. aur., St. 3, Aufrollungsform (2½ ×).

Stamm 2. Eine ähnliche Erscheinung wie mit dem eben besprochenen braunen Stamm 3 wurde auch mit dem rosa Mikrokokkenstamm (St. 2) erzielt. Von der mit NH_3 behandelten Röhrchenkultur wurden während einer Zeit von 2 Monaten 9 Ausstriche hergestellt, ohne daß aber kulturelle oder morphologische Veränderungen eintraten. Erst bei dem 10. Ausstrich, der ca. 5 Monate nach der NH_3-Behandlung vorgenommen wurde, zeigte die sonst glatte, glänzende Kolonie eine rauhe, runzelige Ober-

fläche. Auch diese Form wurde noch als 2 RR weiter untersucht (vgl. S. 18).

Stamm 1. Dieser Sarcina lutea-Stamm wurde vor der Behandlung mit Ammoniak einer 25 Min. dauernden Erhitzung auf 60—61° C unterworfen; zu den Versuchen diente die aus dem erhitzten Stamm gezüchtete Schrägagarkultur. Die erste Ausstrichserie war ohne Befund. Bei der zweiten Serie, die 3 Tage nach der NH_3-Behandlung ausgestrichen war, waren auf der Platte, die von der Kultur mit dem NH_3-Zusatz 1 : 100 hergestellt war, neben den gewöhnlichen gelben Kolonien einige etwas heller gefärbte. Auch bei der 3. Ausstrichserie (4 Tage nach der NH_3-Behandlung) und bei den Ausstrichen von allen 3 NH_3-Kulturen waren diese hellen Kolonien neben den gelben zu sehen. Besonders die Kultur mit dem NH_3-Zusatz 1 : 100 brachte viele, etwa 50% dieser weißlichen Formen hervor. Das mikroskopische Bild zeigte Sarzinen von etwas geringerer Größe. Die weißlichen Kolonien wurden auf die verschiedensten Nährböden geimpft, konnten aber trotz wiederholter Versuche nicht zum Anwachsen gebracht werden. Bei der Bildung der hellen Kolonieform handelte es sich also wahrscheinlich um schnell absterbende Zellen.

Eine vor über einem Jahr mit NH_3 behandelte Kultur des Stammes 1, die in der NH_3-Bouillon aufbewahrt wurde, zeigte neben sehr kleinen Sarzinen einige große Einzelkokken von der Größe der Kokken der Ausgangssarzine.

Versuche mit erhöhten NH_3-Zusätzen, sowie mehrmalige Behandlung einer Kultur mit Ammoniak führten zu keinem Erfolg. Über den Einfluß der NH_3-Behandlung kann also folgendes festgestellt werden:

1. Es konnten rauhe Kolonieformen erzielt werden, von denen sich eine als konstant fortzüchtbar erwies (R-Form).
2. In anderen Fällen traten anders gefärbte Kolonien auf. Diese konnten jedoch auf anderen Nährböden nicht zum Anwachsen gebracht werden.
3. Ein Stamm (Sarc. lutea) zerfiel in große Einzelkokken und kleine Sarzinen.

4. Behandlung mit Karbolsäure.

In der folgenden Versuchsreihe wurden die Kokken und Sarzinen nach der von Kuhn angegebenen Methode mit Karbolsäure vorbehandelt, um sie zu Umwandlungen zu veranlassen.

Es wurde Karbolsäure in den Verdünnungen 1 : 100, 1 : 200 zu je 1 ccm in sterile Röhrchen gefüllt, und hierin die verschiedenen Stämme verrieben und für bestimmte Zeiten belassen, z. B. 1 Min., 1½, 2, 2½, 3, 3½ Min. usw. Sodann wurde eine Öse von dem Material auf einer Agarplatte ausgespatelt. Der Versuch wurde mit 10 Stämmen ausgeführt (Stämme 1—7, 10, 11, 14).

Die Stämme aus den Verdünnungen 1 : 100 wuchsen nicht an (bei 1 Min. langer Behandlung) dagegen alle aus den Verdünnungen 1 : 200, und zwar wurden die Behandlungszeiten 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½ und 6 Min. gewählt.

Nur bei Stamm 3 trat nach der 3½ Min.-Behandlung eine Besonderheit auf: es wurden Einzelkokken, Diplokokken, Tetraden und Viererketten gefunden. Die Diplokokken besaßen einen größeren Durchmesser als die der Stammkultur (erstere hatten einen Durchmesser von ungefähr 2,2 μ, die letzteren dagegen nur von 1,4—1,9 μ).

Auch die Zellen der 6 Min.-Kultur zeigten größere Zellen. Indes war diese Erscheinung nur vorübergehend, nach einigen Passagen fanden sich nur noch die Ausgangsformen vor.

Einmal wurde Stamm 3 24 Std. in der Phenollösung 1 : 200 belassen und dann sowohl auf einer Bouillon-Agar- als auf einer Traubenzucker-Agarplatte ausgespatelt. Der Stamm war so geschwächt, daß er nur noch auf der Traubenzuckerplatte anwachsen konnte. Die Zuckerplattenkultur erwies sich als normal fortimpfbar, obgleich sich in ihr auch Zellen verschiedener Größe vorfanden.

Die Karbolsäure kann also vorübergehend unregelmäßige Zellformen hervorrufen und die Vermehrungsfähigkeit hemmen.

5. Einwirkung von Kochsalz.

In einer Versuchsreihe wurden die Stämme 1—14 einer Einwirkung von Kochsalz unterworfen. Die Stämme wurden sowohl auf festen Agar- wie auf flüssigen Bouillonnährböden gezüchtet, denen NaCl in Mengen von 1—6% hinzugesetzt war. Nach einigen Tagen, einigen Wochen und schließlich mehreren Monaten angestellte Untersuchungen zeigten weder kulturelle noch morphologische Besonderheiten, bis auf Stamm 3 und 2:

Der auf 1 proz. NaCl-Bouillonschrägagar vorgezüchtete braune Mikrokokkenstamm 3 wuchs nach mehr als 1 jähr. Kultur auf diesem Nährboden, auf eine Dextroseagarplatte ausgestrichen, anfangs r a u h an. Nach einigen Tagen hatte die Kolonie aber wieder normales glattes Wachstum. Diese Erscheinung wurde zweimal beobachtet.

Ein anderer Koloniestrich dieser Kultur zeigte folgendes: Nach 24 Std. langer Bebrütung war der linke Teil des Striches (links = Ansatzstelle des Striches) r a u h gewachsen; das rauhe Wachstum ging allmählich in das glatte, normale über. Vom rauhen und glatten Teil des Striches wurden getrennte Agarstriche angelegt, die ebenfalls rauh bzw. glatt anwuchsen. Nach ungefähr 14 Tagen war auf allen 3 Platten nur die rauhe Kolonieform vorhanden. Diese war konstant fortzüchtbar.

Der rosa gefärbte Mikrokokkenstamm 2, der über ein Jahr in 6 proz. NaCl-Bouillon vorgezüchtet war, ergab beim Ausstreichen auf Dextroseagar im Koloniestrich eine einzelne rauh anwachsende Kolonie, ähnlich wie die früher genannte rauhe Wuchsform des Stammes 2. Auch diese Kolonie konnte in unveränderter Form weitergezüchtet werden.

Vorbehandlung mit Kochsalz rief demnach in 2 von 14 Fällen R-Formen hervor.

6. Behandlung mit Milchsäure.

Versuche, bei denen die Kokkenstämme in Bouillon mit Zusatz von Milchsäure ($p_H = 6$) vorgezüchtet wurden, zeigten in kultureller, morphologischer sowie physiologischer Hinsicht völlig unveränderte Eigenschaften.

7. Behandlung mit arseniger Säure.

4 Röhrchen mit je 10 ccm Bouillon erhielten vor dem Sterilisieren einen Zusatz von 1,25, 2,5, 5,0 bzw. 10,0 mg Arsentrioxyd. Sodann wurde jedes der Röhrchen mit einer Öse voll von der S a r c i n a l u t e a - Kolonie (St. 1) beimpft und einige Tage bei 30°, später bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Ausstriche auf Traubenzucker-Agarplatten, die nach etwa 4 Wochen vorgenommen wurden, wiesen verschieden große Kokkenformen auf. (Aus-

striche aus der Bouillon mit 10 mg Zusatz zeigten kein Wachstum.) So zeigte der Stamm mit 2,5 mg Zusatz nur ca. 1,7 μ große Kokken gegenüber ca. 2,1 μ großen der Ausgangskultur. In der Kultur mit 5,0 mg Zusatz konnten sogar Größenabmessungen bis 2,9 μ gemessen werden. Es gelang aber nicht, diese verschieden großen Formen zu isolieren. Mit der Zeit verloren sich die Größenunterschiede auf dem Agar ohne den Giftzusatz.

Die Plattenkultur, die aus der Bouillon mit 1,25 mg As_2O_3-Zusatz hervorgegangen war, zeigte 2 verschieden große und zusammengesetzte Kolonietypen. In der Farbe unterschieden sich die Kolonien nicht. Die größere der beiden Kolonieformen war von homogener, trocken-breiiger Konsistenz, während die kleine in sich derartig fest war, daß man sie nur als Ganzes von der Agaroberfläche abheben konnte. Die großen Kolonien setzten sich aus Kokkenhäufchen, deren einzelne Zellen 1,3 μ maßen, zusammen. Dagegen wiesen die kleinen Kolonien homogene Massen unregelmäßig geformter Einzel- und Diploformen auf, die durchschnittlich etwas größer waren als die der großen Kolonien. Beide Kolonietypen wurden auf Schrägagar gebracht und nach gewissen Zeitabständen (etwa alle 4 Wochen)



Abb. 2. Micr. roseus, St. 2. Auftreten der R-Formen nach LiCl-Behandlung (1 : 1).

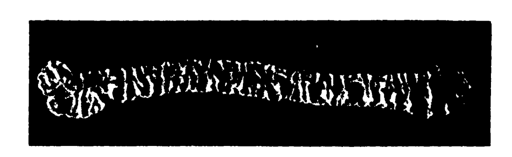


Abb. 3. R-Form von Micr. roseus, St. 2 (Xyloseplatte). Vorbehandlung mit LiCl → 2 R (1½ ×).

auf neuen Schrägagar übertragen. Es stellte sich heraus, daß die zweiten Schrägagarkulturen noch dieselben Formen hervorbrachten wie eben beschrieben wurde. Dasselbe konnte bei der dritten und vierten Schrägagarpassage, die etwa 18 Std. alt war, festgestellt werden. Bei einer etwa 6 Monate späteren Untersuchung war die ursprüngliche Sarzinenform wieder aufgetreten, die sich nun konstant weiterzüchten ließ.

Behandlung mit Arsentrioxyd war also imstande, bei Sarc. lutea unregelmäßige Zellformen hervorzurufen.

8. Vorbehandlung mit Wasser.

Ein anderer Variationsversuch wurde nach den Vorschriften von G. Werner angestellt. Dieser Autor fand bei Ruhr-, Typhus- und Colibakterien Veränderungen, die durch einen Aufenthalt der Bakterien in sterilem destillierten Wasser hervorgerufen waren. Er stellte Unterschiede in der Gestalt der Zellen, ferner in der Form, insbesondere Trockenheit, Verschleimung und Verkümmerung der Kolonien fest.

Von Werner wurde eine kleine Öse voll Bakterienmaterial in einem mit 10 ccm aqu. dest. ster. gefüllten Röhrchen verrieben und bei Zimmertemperatur, vor Licht geschützt, aufbewahrt. Nach 14 Tagen wurden die ersten Abimpfungen auf Platten ausgestrichen (in vorliegenden Versuchen wurden Traubenzucker-Agarplatten genommen). Der oben zitierte H. Schmidt — ebenso wie G. Werner aus der Kruseschen Schule — fand in den mit Sarzinen beimpften Wasserkulturen „nach 8—10 Wochen insofern Veränderungen, als aus den normalen grampositiven Sarzinen gramnegative „Zwergformen“ entstanden. Auf frische Nährböden gebracht, wuchsen diese jedoch wieder zu vollständig normalen Sarzinen aus“.

Dieser Wasserversuch wurde mit 26 Stämmen (1—17, 20—25) durchgeführt. Nach 35 Tagen wurden zum erstenmal Platten von den Aufschwemmungen ausgestrichen. Es zeigte sich, daß von 26 nur 3 Stämme (St. 2, 7, 8) nicht angewachsen waren, die übrigen wuchsen gut, und zwar wie die Stammkultur. Weder kulturelle noch morphologische Unterschiede waren festzustellen. Die mikroskopischen Bilder wiesen kleinere Formen auf, wie H. Schmidt es festgestellt hatte. Die Gramfestigkeit hatte anscheinend etwas nachgelassen.

Die Versuchsreihe wurde wiederholt, auch einmal durch Verreiben der Kulturen in sterilem Leitungswasser; auch hier wurde nichts Neues gefunden.

Durch diese Hungerkur war es also nicht möglich, die Kokken und Sarzinen umzuändern.

9. Aufbewahren auf sterilem Stroh.

Es wurden nun die Kokken solchen Bedingungen ausgesetzt, wie sie gelegentlich in der Natur anzutreffen sind. Umwandlungen von Bakterien müßten in erster Linie unter natürlichen Bedingungen vor sich gehen.

Zu diesem Zwecke wurde sterilisiertes Stroh gewählt. Das Stroh wurde gehäckselt, dreimal autoklaviert und in sterile Röhrchen gebracht. Alsdann wurden Aufschwemmungen von 20 Stämmen (1—20) über dem Stroh je eines Röhrchens verteilt. Nach 3 Monate langer Aufbewahrung wurde ein Stückchen Stroh in Traubenzucker-Bouillon geimpft. Von den 20 Stämmen wuchsen 8 (St. 1, 2, 3, 6, 9, 10, 13, 14) in der normalen Ausgangsform wieder an. Kulturelle und morphologische Abweichungen waren nicht festzustellen. Nur ein Stamm wollte anfangs nicht auf der Dextroseagarplatte anwachsen. Erst, nachdem er 1 Woche in der Dextrosebouillon verblieben war, zeigte er auch auf festen Nährböden Wachstum.

Aufbewahren auf Stroh vermochte also keine morphologischen oder kulturellen Abweichungen hervorzurufen.

10. Vorzüchtung in Leber-Leber-Bouillon.

24 Stämme (St. 1—24) wurden in Leberbouillon geimpft, die Leberstückchen (vom Rind) enthielten. Nach längerer Vorzüchtung in diesem

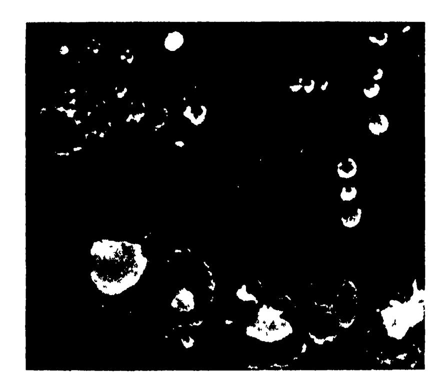


Abb. 4. Infektion von Kokkenkolonien durch Milben hervorgerufen. Nur auf den Kolonien selbst wachsen Fremdkeime (2 ×).



Abb. 5. R- und S-Form von Micr. pyog. aur., St. 3, nach Vorzüchtung in Leber-Leberbouillon ($^2/_3$ ×).

Nährmedium wurden Platten ausgestrichen. Weder die Zellen noch die Kolonien wiesen Besonderheiten auf. Nach mehrere Monate langer Vorzüchtung des Stammes 3 traten jedoch neben den normalen gelb-orangefarbenen Kolonien solche von bedeutend heller er Farbe auf. Beide Koloniearten wurden isoliert und die Platte mit beiden Reinkulturen aufbewahrt (Abb. 5). Nach einigen Wochen waren die dunklen Strichkolonien runzlig-rauhhäutig geworden (Abb. 5); sie zeigten nicht mehr die normale breiige Konsistenz, sondern ließen sich stückchenweise von der Agaroberfläche abbrechen bzw. abheben. In dem späteren Kapitel über R- und S-Formen (S. 18) werden die helle Form als 3 S, die rauhe als 3 R und der Ausgangsstamm als 3 N weiterbehandelt.

Durch Vorzüchtung in Leber-Leberbouillon konnten somit eine R- und eine S-Form erzielt werden.

Das Ergebnis aller bisher aufgezeichneten Versuche war also, daß das ursprüngliche Ziel dieser Arbeit, den Nachweis der Umwandelbarkeit von kugelförmigen Bakterien in Stäbchen zu führen, nicht erreicht wurde, daß also die Ergebnisse von Schmidt-Kehl und Helmut Schmidt nicht bestätigt werden konnten.

Das Augenmerk wurde nun auf die

B. Variabilität der physiologischen Eigenschaften

gerichtet.

Die auf alle möglichen Weisen vorbehandelten Stämme wurden auf ihre physiologischen Merkmale hin geprüft und hierbei mit denen der 36 Ausgangsstämme verglichen. Untersucht wurden folgende Eigenschaften:

1. Säuerungsvermögen von Milch- und Traubenzucker auf Chinablauplatten und eventuelles Gasbildungsvermogen aus diesen Zuckern (mittels Agarschüttelkultur).
2. Verhalten auf Milchagar.
3. Verhalten in Magermilch.
4. Verhalten im Gelatinestich.
5. Nitratreduktionsvermögen.
6. Indolbildungsvermogen.
7. Hämolysierungsvermogen auf Hammelblutagarplatten.
8. Wachstum auf Kartoffeln.

Die Reinkulturen waren vorbehandelt mit: Lithiumchlorid, Ammoniak, Karbolsäure, Kochsalz, Arsentrioxyd, Wasser, Pepton, Harnstoff, Leber-Leberbouillon, KNO_3 (1, 3, 5%), Kreide, Milchsäure ($p_H = 6$), angetrocknet auf Stroh, oder sie waren mehrere Monate unter Paraffinabschluß auf Schrägagar gehalten worden.

Im Verlaufe dieser Untersuchungen ergaben sich folgende Abweichungen:

Sarcina lutea (St. 1): Eine Säurung von Traubenzucker konnte im Gegensatz zur Urprüfung, wo sie zwar erst nach mehreren Tagen zu beobachten war, bei den Stämmen nicht mehr festgestellt werden, die einer Erhitzung und einer Arsen- oder Lithium-Behandlung unterzogen waren. Bezüglich des Verhaltens im Gelatinestich hatte die Urprüfung anfänglich keine Verflüssigung, nach etwa 30 Tagen Verflüssigung zu $^1/_3$ ergeben. Die Nachprüfung zeigte, daß der mit NH_3, sowie mit 2,5 und 5 mg As_2O_3 vorbehandelte Stamm schon eine nach einem Tage beginnende Verflüssigung hervorrufen konnte. Die Kulturen nach Vorbehandlung mit 1,25 mg As_2O_3

und ebenso mit 3% LiCl vermochten die Gelatine aber auch, ähnlich wie die Ausgangskultur, erst nach etwa einem Monat zur Hälfte zu verflüssigen.

Micrococcus 3: Während bei der Urprüfung Dextrose nur ganz schwach gesäuert wurde, konnten die behandelten Kulturen, d. h. der Peptonstamm, der KNO_3-Stamm, sowie ein einmalig 120 Min. auf 60° erhitzter und ein dreimalig 65 Min. auf 60° erhitzter Stamm, ferner ein Stamm aus Leber-Leberbouillon eine etwas stärkere Säurung hervorrufen. In diesen Fällen trat die Säurung auf der Chinablauplatte als schmale, blau gefärbte Zone rings um die Kolonie in Erscheinung. Der Milchzuckersäurungsversuch (bei der Urprüfung negativ) zeigte bei der Nachprüfung auf der Chinablauplatte eine geringe Farbansammlung in der Kolonie (d. h. ein grünlicher Kern auf braunem Grund) und einen Farbentzug aus der der Kolonie benachbarten Agarzone. Ersteres muß wohl als geringe Säurung gedeutet werden. Der Peptonstamm hatte keine derartig aufgehellte Zone. — Anscheinend regte die besondere Stickstoffquelle (Pepton, KNO_3, Harnstoff) den untersuchten Kokkus zur Bildung von Laktase — adaptives Enzym im Sinne von Karström und Virtanen — an.

Micrococcus 2: Im Gegensatz zur Urprüfung wurde Dextrose von allen vorbehandelten Stämmen schwach gesäuert.

Micrococcus 4: Die Nachprüfung ergab als Abweichungen: Der dreimal 25 Min. lang auf 61° C erhitzte Stamm zeigte auf Milchagar nur noch schlechtes Wachstum und keine Peptonisierung mehr. Auch das Gelatineverflüssigungsvermögen fehlte. Letzteres war auch bei den anderen vorbehandelten Stämmen, mit Ausnahme des laufend weiter gezüchteten, der Fall.

Micrococcus 5: Bei der Nachprüfung säuerten die erhitzten Stämme Milchzucker in geringem Grade.

Tetracoccus 6: Die Nachprüfung ergab, daß ein mit Ammoniak behandelter Stamm Hämolysierungsvermögen erlangt hatte. Derselbe Stamm konnte Gelatine nicht mehr verflüssigen (Beobachtungsdauer 4 Wochen).

Micrococcus 7: Auch bei diesem Stamm hatte die Ammoniakbehandlung Ausbleiben der Gelatineverflüssigung zur Folge.

Bei 3 von 4 Lab-Säurekokken, die vor einem Jahr und länger im hiesigen Institut untersucht waren, konnte kein Caseinabbauvermögen mehr festgestellt werden.

Auf Grund dieser umfangreichen physiologischen Versuche kann somit festgestellt werden, daß sich die Ausgangsstämme als sehr konstant in ihren physiologischen Merkmalen erwiesen haben.

Ob die angegebenen Abweichungen lediglich durch die verschiedene Vorbehandlung der Stämme bedingt waren oder auch durch das Altern, läßt sich mit Bestimmtheit natürlich nicht entscheiden. Da aber die Abänderungen immer nur bei einer ganz bestimmten Vorbehandlung des Stammes eintraten und nicht bei den übrigen Behandlungsarten, dürfte weniger das Alter, als die besondere Vorbehandlung die Stämme zu der betreffenden Variation veranlaßt haben.

Um weitere Beweise hierfür zu erbringen, wurden frisch eingefangene Stämme vor und nach einer bestimmten Vorbehandlung morphologisch und physiologisch untersucht.

Es wurden Euterkokken gewählt, weil die Erfahrung im hiesigen Institut gezeigt hat, daß nicht selten in ein und demselben Euter Kokken

mit verschiedenen Eigenschaften nebeneinander vorkommen, so daß offenbar ein großes Variationsvermögen vorherrscht.

Als Untersuchungsobjekte dienten 4 Euterkokken, die aus aseptisch gewonnener Kuhmilch isoliert wurden. Bei der Gewinnung der Milch wurde nach den Vorschriften von Henneberg verfahren:

Das Euter und der untere Bauchteil der Kuh wurden mit einem sauberen, nassen Tuch abgewaschen und mit Melkfett eingerieben. Die Reinigung der Zitzenenden geschah mittels Alkohol. Die Milch wurde dem Mittelgemelk entnommen.

Die 4 Stämme wurden nach der Kuhnschen Erhitzungsmethode behandelt. Es traten hierbei weder morphologische noch physiologische Unterschiede auf. Die auf 58—60° erhitzten Stämme wurden zum Ausgangspunkt eines neuen Erhitzungsversuchs gemacht; auch dieser hatte negative Resultate. Auch die Erhitzung des aus der zweiten Erhitzung hervorgegangenen Stammes brachte kein anderes Ergebnis. Die Erhitzungsversuche wurden nach einigen Wochen wiederholt, jedoch wiederum mit negativem Erfolg. Im Gegensatz zu Steck u. A. konnte festgestellt werden, daß sich die 4 Euterkokkenstämme als wenig hitzeresistent erwiesen. 60° C wurde keine 30 Min. ertragen, eine 20 Min. lange Erhitzung hatte sie scheinbar schon so sehr angegriffen, daß sie erst nach mehreren Tagen anwuchsen. Die Pasteurisierungstemperatur von 63° wurde keine 5 Min. ertragen. Mit zwei Stämmen (Vr, VI) wurden ferner die Vorbehandlungen mit Ammoniak, Karbolsäure und Lithiumchlorid durchgeführt. Trotz wiederholter Versuche wurden keine morphologischen, kulturellen und physiologischen Abweichungen gefunden.

Es war also auch bei frisch eingefangenen Labkokken eine Umwandlung nicht zu erzielen.

Doch wäre es verfrüht, auf Grund dieser Ergebnisse den Schluß zu ziehen, daß die mit den anderen Kokkenstämmen erzielten morphologischen, kulturellen und physiologischen Variationen lediglich als ein Ergebnis der Alterung der betreffenden Stämme zu betrachten sind. Denn einmal wurden bei den Versuchen mit frisch isolierten Kokken nur 4 Stämme benutzt, eine zu geringe Anzahl, als daß man daraus weitgehende Schlüsse ziehen dürfte. Anderseits ist aber die Tatsache wesentlich, daß die 36, etwa 1½ Jahre unter Paraffinverschluß gehaltenen Kulturen, keine Auffälligkeiten in den Impfstrichen zeigten, daß sie sich, unter Berücksichtigung einer geringen Antrocknung der Kolonieoberfläche, so unverändert erhalten hatten, wie die ursprünglich isolierten Stämme. Auch die fortlaufend weiter übertragenen Stämme wiesen keine Veränderungen auf. Die gefundenen Variationen sah man, wie bereits hervorgehoben wurde, nur bei den behandelten Stämmen.

C. Kolonievarianten: Farbvarianten. R- und S-Formen.

Der folgende Teil dieser Arbeit befaßte sich mit einem näheren Studium der im Laufe der Zeit gefundenen anormälen Kolonietypen.

Es waren die Mikrokokkenstämme 3 (orange-gelb) und 2 (rosa), die teils in der Farbe abweichende Kolonien hervorbrachten (eine helle gelbe Variante von Stamm 3 und eine weiße von Stamm 2), teils im Bau andere, nämlich runzelig rauhe Formen.

1. Farbvarianten.

Über plötzliches Auftreten anders gefärbter Kolonien bei Bakterienkulturen findet man schon in der älteren Literatur Angaben.

Es sei hier besonders auf eine Arbeit von R. Neumann aus dem Jahre 1897 verwiesen, dem es gelang, aus Micr. pyog. α aur. eine zitronengelbe, eine weiße und eine fleischfarbene Form zu zuchten. Er erhielt diese dadurch, daß er jedesmal, wenn sich in der Kolonie eine unterschiedliche Farbstoffnuance zeigte, diese Stelle vorsichtig auf anderen Nährboden ubertrug.

1925 gelang es Hajos, eine Methode aufzufinden, nach der er Staphylococcus aureus in Staph. citreus überführen konnte. Er erhitzte zu diesem Zwecke die Aureus-Kultur 1 Std. lang in einem Wasserbad von 50° C und legte davon Kulturen an. Der fragliche Aureus-Stamm bildete aber auch ohne die Erhitzung nach 10—15 Tagen kleine, stecknadelkopfgroße Subkolonien, die sich als Staph. citreus erwiesen.

Bemerkenswert ist weiter eine Mitteilung Baerthleins uber Wahrnehmungen bei einem Micrococcus roseus-Stamm; er konnte bei diesem durch Aussaat aus alten Kulturen auf Agarplatten nach 4—5 Tagen vier verschiedene Kolonietypen isolieren: 1. „Mittelgroße, trockene, unregelmäßig umrandete, rosafarbene Kolonien, deren Oberfläche ein netzformiges Balkenwerk aufweist, so daß eine typische Rosettenform entsteht." 2. Kleinste, runde, saftige, dunkelrosa gefarbte Kolonien mit glatter, glanzender Oberfläche. 3. Kleine bräunlichrosa gefärbte Kolonien, die sonst der zweiten Variante glichen. 4. Grau-weißlich gefärbte Kolonien.

In den Mischkolonien konnte Baerthlein infolge der Farbdifferenzen „häufig in Sektorenform angeordnete Bestandteile der einzelnen Kolonietypen" gut erkennen. Vermutlich wird die unter 1. genannte Kolonieform den in dieser Arbeit beschriebenen R-Formen 2 R bzw. 2 RR geähnelt haben.

Stamm 2 w: Wie weiter oben beschrieben wurde (S. 7), gelang es, den rosa Micrococcus 2 zur Abspaltung einer weißen Variante (2 w) zu ver-



Abb. 6. Bildung von rosafarbenen Sektoren auf der Kolonie der weißen Farbvariante von Micr. ros., St. 2, Maltoseplatte (1½ ×).

anlassen. Nachdem diese durch einige Plattenpassagen reingezüchtet war, wurde sie auf Chinablauagarplatten mit 17 verschiedenen organischen Zusätzen (vor allem Kohlehydraten s. Tab. 2) gebracht und beobachtet. Auf dem mit Maltose versetzten Agar erschienen nach einigen Tagen am Rande des im Impfstrich kräftig, weiß wachsenden Stammes kleine rote Pünktchen, die mit jedem Tage größer und ausgeprägter wurden. Während anfänglich nur kleine runde Stellen zu sehen waren, konnte bald festgestellt werden, daß sich diese nach der Mitte des Impfstrichs hin zuspitzten, so daß der Koloniestrich am Rande eine scharfe Zähnung erhielt. Abb. 6 läßt dies gut erkennen. Durch vorsichtiges Abimpfen der rosa Stellen erhielt man eine Reinkultur des rosa gefärbten Ausgangsstamm 2. Bei den rosa Sektoren fiel auf, daß sie das Bestreben zeigten, sich völlig miteinander zu vereinigen: anfangs waren die nach außen hin gelegenen Teile verschmolzen; diese Verschmelzung schritt langsam nach der Mitte zu fort. So entstand nach einigen Tagen eine zusammenhängende rosa Zone, die den inneren weißen Teil der Kolonie umrahmte und immer mehr zurückdrängte.

Etwas mehr als die Hälfte der ursprünglichen Breite der Kolonie wurde schließlich rosa, während der Innenteil weiß blieb. Auf Grund einer mehrwöchigen Beobachtung war anzunehmen, daß sich die Farben in diesem Zustand das Gleichgewicht hielten.

Dieser eigenartige Rückschlag der Koloniefarbe von weiß in rosa könnte auf Unterschiede in den Sauerstoffverhältnissen zurückzu-

führen sein, bei der Annahme, daß eine rosa wachsende Kolonie mehr Sauerstoff bedarf als eine weiße. So wäre es zu erklären, daß zuerst am Rande des Impfstriches, wo der Luftsauerstoff besser an die einzelnen Zellen gelangen konnte, rosa Kolonien auftraten. An den Enden eines Impfstriches, wo die Sauerstoffverhältnisse noch günstiger liegen, müßten demnach am meisten rosa Kolonien auftreten. Dies war in der Tat der Fall.

Die lange Vorzüchtung des Ausgangsstammes 2 in Peptonwasser — also einer Flüssigkeit mit sehr ungünstigen Sauerstoffbedingungen — mag umgekehrt dazu beigetragen haben, daß eine Umbildung von rosa in weiß stattfand. Es handelte sich wahrscheinlich um einen ähnlichen Fall, wie ihn Lubinsky beschreibt, der bei anaerober Bebrütung von Microc. pyog. α aur. eine farblose Kultur erhielt[1]).

Das mikroskopische Bild von Stamm 2 w zeigte Kokken, einzeln und in Trauben gelagert, von verschiedener Größe (Durchschnitt: 1,7 μ).

Stamm 3 S: Das oben (S. 14) beschriebene Umschlagen des Micrococcus 3 in eine hellbraun gefärbte Form infolge mehrmonatiger Züchtung in Leber-Leberbouillon mag ebenfalls auf die ungünstigen Sauerstoffverhältnisse in dieser Nährlösung zurückzuführen sein. Indes war dieser Farbwechsel im Vergleich zu Stamm 2 w bedeutend konstanter. Lediglich in einem Falle konnte hier ein Nachdunkeln beobachtet werden. Als nämlich eine homogene Bouillonaufschwemmung von Micr. 3 (gelborange) und seinen Varianten 3 R (rauh) und 3 S (hellbraun) in Zickzacklinie auf Agarplatten ausgestrichen wurde, zeigte sich folgendes: die eingesäten Formen traten in wahlloser Reihenfolge in den Strichen wieder auf (vgl. S. 21). Daneben befand sich aber auch eine helle Kolonie, die runzelig wuchs. Bei dieser hellen Kolonie konnte beobachtet werden, daß sie von Tag zu Tag nachdunkelte, bis sie schließlich die Farbe der anderen rauhen Kolonien angenommen hatte. Auf Schrägagar gebracht, wuchs sie erst hell und rauh, dunkelte aber immer mehr nach.

Farbwechsel bei Bakterienkolonien kann also wahrscheinlich durch veränderte Luftsauerstoffverhältnisse erzielt werden.

2. R- und S-Formen.

Im folgenden Abschnitt wurden Versuche mit Kolonievarianten angestellt, die in struktureller Hinsicht von ihren Ausgangsformen abwichen. Es handelte sich dabei um die weiter oben beschriebenen 3 verschiedenen Formen des rosagefärbten Micrococcus 2 und 2 des gelborangefarbenen Micrococcus 3. 2 Varianten von Stamm 2 waren bekanntlich rauhrunzelig: Stamm 2 R trat gelegentlich eines Lithiumchlorid-Versuches auf, Stamm 2 RR bei einem Ammoniak-Versuch. Die dritte, glatte Form (2 S) war die normale Ausgangsform in dem LiCl-Versuch, bei dem die rauhe entstand. Beim Micrococcus 3 handelte es sich neben seiner normalen Ausgangskolonieform (3 N) um die aus Leber-Leberbouillon gezüchtete rauhe Form (3 R) und die glatte, helle (3 S).

Die Bezeichnungen „R" (rough) und „S" (smooth) wurden in Anlehnung an die Bezeichnungen der englischen und amerikanischen Bakteriologen, besonders Arkwright, Griffith und Hadley gewählt. Auf dem Gebiete der Kokken sind vor allem R- und S-Formen von Pneumo-

[1]) Bei Lehmann-Neumann findet sich die Notiz, daß auf Agarkolonien von rosa Kokken weiße Sektoren beobachtet wurden.

kokken bekannt geworden. Nähere Forschungen über R- und S-Formen bei Mikrokokken und Sarzinen sind, soweit ersichtlich, noch nicht angestellt.

Stamm 3 N, R, S. Die Kolonie der hellbraunen Variante 3 S unterschied sich von der des Ausgangsstammes 3 N lediglich durch die Farbe. Beide Kolonien waren glattrandig rund, erhaben, matt bis feuchtglänzend. Die rauhe Form 3 R dagegen bildete runde, unregelmäßig umrandete, runzelige Kolonien, die sich lederartig in kleinen Fetzen von der Agargrundlage abheben ließen. In Bouillon, Traubenzucker- und Milchzuckerbouillonröhrchen bildete 3 R eine dicke, geriefelte Haut auf der Oberfläche der Flüssigkeiten, die schließlich auf den Boden sank und durch eine neue ersetzt wurde. Stamm 3 N gab einen homogenen und 3 S einen ungleich gekörnten Bodensatz. Morphologisch zeigten 3 S und 3 N keine Abweichungen voneinander. Im Gegensatz zu der ersten Reinkultur von Stamm 3 waren bei Stamm 3 N vereinzelt Tetraden und unter bestimmten Bedingungen größere Sarzinenpakete zu sehen, eine Erscheinung, die nicht selten bei Mikrokokken angetroffen wird und die Lehmann-Neumann zu der Annahme veranlaßt, Sarzinen als forma sarcina von Mikrokokken anzusehen. Diese, von Altmann bestrittene Ansicht kann auf Grund vorliegender, annähernd 2 jähr. Untersuchungen nur unterstützt werden. Ein interessantes Ergebnis in dieser Beziehung zeigten Federstrichkulturen, die von Stamm 3 S angelegt wurden: Die erste Strichreihe (größte Einsaat) zeigte verschieden große Einzelkokken, ein weniger auffälliger Befund, da die eingesäten, älteren Zellen sich meistens in der Größe von den sich neu bildenden unterscheiden. Paketbildung war nicht zu beobachten. Das ist vielleicht damit zu erklären, daß infolge der großen Einsaat verhältnismäßig wenig Nahrung vorhanden war und infolgedessen auch geringe und langsame Vermehrung, wodurch die Kokken genügend Zeit fanden, sich gänzlich voneinander zu trennen und nicht in Verbänden zusammen hängen bleiben. In der 2. und 3. Federstrichreihe — die durch Überspülen mit Bouillon nährstoffreicher geworden waren — traten dagegen Sarzinen auf (vgl. Abb. 7).

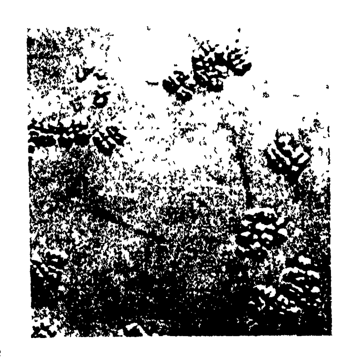


Abb. 7. Micr. pyog. aur., St. 3 S, „forma sarcina", Federstrichkultur, 3. Verd. (500 ×).

Die Federstrichkultur 3 R zeigte in der ersten Reihe Einzelkokken neben einzelnen größeren Sarzinen (jede Zelle ca. 1,5 μ groß) und Tetraden. Die zweite und dritte Reihe ließen Kokken in Traubenform erkennen. Die erste Reihe wies aber noch eine interessante Erscheinung auf: Bei wiederholten Versuchen konnte immer eine Inselbildung beobachtet werden. Hierbei handelte es sich um zusammengeballte Kokkenmassen, die von einer bakterienfreien Flüssigkeitszone umgeben waren, an die sich dann eine mit Kokken unregelmäßig besäte Zone anschloß. Abb. 8 zeigt diese Inselbildung. Für die Deutung dieser Erscheinung konnte keine überzeugende Erklärung gefunden werden. Es wäre denkbar, daß die Inseln kleinste Ansammlungen der häutigen, lederartigen Einsaat waren, und die freie Zone irgendeine, die Hautbildung bedingende schleimartige Substanz.

Es ist aber hervorzuheben, daß bei Stamm 3 R eine Schleimbildung nicht beobachtet werden konnte.

Es sei hier noch bemerkt, daß eine etwa 1½ Jahre lang aufbewahrte Federstrichkultur von Stamm 3, die 3 Monate nach der Reinzüchtung angelegt wurde, ebenfalls Sarzinen und Tetraden neben Einzelkokken und Diploformen enthielt. 1½ Jahre vorher wurden einwandfreie Staphylokokken festgestellt.

Eine ebenso alte Vollmilchfederstrichkultur zeigte einzelne korrodierte Fetttröpfchen.

Physiologisch unterschieden sich die Stämme 3 N, R und S nicht voneinander.

Bei den Milchagarplatten der drei Stämme war lediglich festzustellen, daß 3 S den Agar nach 24 Std. stark aufgehellt hatte, 3 N gut, 3 R dagegen gar nicht; der letztere war noch kaum angewachsen. Erst am 2. Tage zeigte auch er Aufhellung; am 3. Tage hatten alle drei gleichmäßig stark aufgehellt.

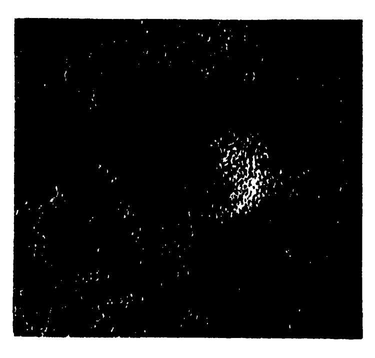


Abb. 8. „Inselbildung" bei der R-Form von Micr. pyog. aur., St. 3 R (250 ×).

Um die Ursache des verschieden lange dauernden Anwachsens der 3 Stämme näher zu studieren, wurden von ihnen u. a. Stichkulturen in Milchagarröhrchen vorgenommen. Dabei stellte sich heraus, daß die Aufhellung bei den 3 Stämmen nunmehr gleichzeitig vor sich ging. Die Erscheinung, daß 3 R in bezug auf die Schnelligkeit des Anwachsens im Stich mit 3 N und 3 S Schritt halten konnte, ist vermutlich auf günstigere Sauerstoffverhältnisse und Ernährungsmöglichkeiten im Agarröhrchen zurückzuführen, im Gegensatz zu denen auf der Agarplatte. Stamm 3 R schien also gegen Sauerstoff empfindlich zu sein und reichliche Nahrung zu beanspruchen.

Bei diesen Prüfungen mit Milchagar-Stichkulturen war aber noch etwas Besonderes bei 3 S zu sehen: Der sonst glatt wachsende Stamm zeigte auf der Agaroberfläche um den Einstich herum dasselbe rauhe, stark runzelige Wachstum wie der dunkle Stamm 3 R, und zwar so stark, daß sich schon nach einigen Tagen blättchenförmige Erhebungen auf der Kolonie bildeten. Auf Bouillonschrägagar übergeimpft, wuchs diese Form (S/R) wieder glatt an. Machte man mit dieser Kultur einen neuen Milchagarstich, so trat wieder die rauhe Form auf. Ein Stich von der rauhen S-Kultur in anderen Milchagar brachte wiederum die rauhe Form hervor. Stellte man aber Stiche der S/R-Form in Bouillonagar her, so ergab sich wieder glattes Wachstum. In Milch- und Traubenzuckeragar gestochen, kamen Kolonien auf, die etwas rauh wuchsen. Diese beiden Zuckeragar mit Chinablauzusatz zeigten aber fast glattes Wachstum. Wenn man die S/R-Form statt in Milchagar zu stechen, auf Milchagarplatten impfte, so wurde nur die glatte und nicht die rauhe S/R-Variante gefunden. Impfte man die S/R- (oder 3 S) Kultur auf Schrägmilchagar, so wuchs sie auf dem unteren Teil rauh, auf dem oberen glatt an. Nach einigen Tagen wurde aber auch der obere Teil immer rauher.

Diese Erfahrungen mit Stamm 3 S lassen sich wie folgt deuten:

3 S wächst glatt auf solchen Nährböden, die entweder weniger gut verwertbare Nährstoffe (Bouillonagar im Gegensatz zu Milchagar) bzw. nicht genügend gut verwertbare enthalten (Milchagarplatte im Gegensatz zu Milchagarröhrchen). Der Stamm wächst dagegen rauh, wenn er den Nährboden gut verwerten kann und dieser reichlich vorhanden ist.

In Anlehnung an die Versuchsanstellung Hadleys wurden 3 R und 3 S — mit einem Übergewicht von R — in Wasser zu einer homogenen Aufschwemmung geschüttelt und eine Öse voll in parallelen Strichen auf einer Dextrose-Agarplatte ausgestrichen und bebrütet. Hadley erhielt bei diesem Versuch, den er mit der R- und S-Form von Bact. lepisepticum und verschiedenen anderen Stäbchenbakterien ansetzte, in den ersten 2 oder 3 Strichen massenhaft R-Kolonien, aber keine S-Formen, sondern diese nur in den folgenden Strichen. Und weiter sah er: „Wenn S-Kolonien in nahem Kontakt mit R-Kolonien erschienen, waren erstere unregelmäßig und entstellt, indem ihre Ränder von den R-Formen eingeschnitten waren."

Was Hadley sah, konnte hier nicht wahrgenommen werden. Die ersten Kolonien in den Strichen waren nicht R-, sondern S-Formen (Abb. 11). Daran anschließend folgten als Übergang zu einigen R-Kolonien Teile von dunkel gefärbten S-Kolonien, die sich nicht von der normalen Kultur 3 N unterschieden.

In der letzten Reihe folgten S-Kolonien. Bei diesen war wiederum interessant zu beobachten, daß die Mitten der Kolonien, die infolge Einritzens des Agars tiefer lagen, leicht rauhes Wachstum zeigten. Ähnliches wurde oben bei dem Stich von 3 S in Traubenzuckeragar festgestellt.

Der eben beschriebene Versuch wurde wiederholt mit einer Aufschwemmung von 3 N und R und S. Auch hier traten die eingesäten Formen in regelloser Reihenfolge in den Agarstrichen wieder auf. Bemerkenswert war eine rauhe Kolonie, die aber hell wuchs wie 3 S. Bei dieser Kolonie konnte beobachtet werden, daß sie von Tag zu Tag nachdunkelte und schließlich die Farbe der R-Form annahm (vgl. S. 18).

Bei einer anderen Versuchswiederholung traten wieder die merkwürdigen aufgerollten Kolonieformen, die gelegentlich eines Ammoniakversuchs erzielt waren (Abb. 1, S. 9), auf.

Stamm 2 S, R, RR. Stamm 2 S war offenbar identisch mit dem Ausgangsstamm 2; er trat zusammen mit 2 R bei einem Lithiumchloridversuch auf.

Auch mit diesen Stämmen wurde der Hadleysche Versuch nachgeprüft. 2 Tage nach dem Ausstrich waren sämtliche Kolonien noch glatt. Am 6. Tage waren R- und S-Kolonien, die wiederum in planloser Reihenfolge gewachsen waren, gut voneinander zu unterscheiden (vgl. Abb. 12).

Die Varianten 2 R und 2 RR wuchsen etwas schleimig.

Physiologische Reihen mit 2 R, 2 RR, 2 S, 2 w, 3 N, 3 R, 3 S.

Die R-, S-, N- und w-Formen der Stämme 2 und 3 wurden auf Chinablauagarplatten ausgestrichen, denen die verschiedensten organischen Substanzen hinzugefügt waren, bebrütet und beobachtet.

Aus Tab. 2 sind die verschiedenen Zusätze sowie das Verhalten auf den betreffenden Nährböden zu ersehen.

Die Tabelle lehrt zunächst, daß das Verhalten der Varianten eines Stammes zu den verschiedenen Nährböden so gut wie gleich war. Eine merkliche Ausnahme machte 2 S, der die Dextroseplatte gut säuerte im Gegensatz zu 2 R und 2 RR. Eine weitere Abweichung war bei den Varianten

Tabelle 2.

	Saccharose 1	Maltose 2	Stärke (Nahrbod. war entfarbt) 3	Inulin 4	Mannit 5	Sorbit 6	Xylose 7	Dextrin (Nährboden war entfärbt) 8
2 RR. . .	(+) trocken, nicht runzelig	(+) trocken, nicht runzelig	0 gl II ganz saftig	0 gl II ganz glatt	+++ stark runzelig	(+)	(+) stark runzelig	0 gl II gl, saftig
2 R . . .	(+) typ.	(+) typ.	0 m II ganz schwach runzelig	0 m II trock., fast glatt	+++ typ.	(+) typ.	(+) typ.	0 fast glatt, II geringe Abblätterung
2 S. . . .	(+)	0	0	0	+++	(+)	+	0
2 w . . .	0 rosa Rand	0 r. R.	0 r. R.	0 r. R.	++ r. R.	+ r. R.	(+) r. R.	0 r. R.
3 N . . .	(+)	(+)	0	(+)	(+) (A)	0 (A)	++	0
3 R . . .	0 typ.	0 typ.	0 gl II z. T. gl. z. T. rauh	0 gl	0 (A) typ.	0 (A) typ.	+ Z typ.	0 gl
3 S. . . .	+	+	0	+	+ (A)	(+) (A)	(+)	0

Erklärung der Zeichen:
0 = keine Farbveränderungen auf den Chinablauplatten, insbesondere den Kolonien.
(+) = stellenweise Blaufärbung der Kolonie.
+ = völlige Blaufärbung der Kolonie.
++ = auch eine Zone rings um die Kolonie ist blau gefärbt (= mäßige bis gute Säuerung).
+++ = starke Säuerung.

von Stamm 3 auf der Xyloseplatte zu sehen, die lediglich von 3 N gut gesäuert wurde.



Abb. 9.



Abb. 10.

Abb. 9. und 10. 2 Entwicklungsstadien einer R-Strichkolonie (Micr. roseus, St. 2) ca. 2 ×.

Tabelle 2.

Galaktose	Alanin	Asparagin	Salicin	Arabinose	Glykokoll (Nahrboden war entfärbt)	Glyzerin	Dextrose	Laktose
9	10	11	12	13	14	15	16	17
(+) ganz klein gekornte Kolonie	0 gl II noch glatter	0 gl II glatt grau-rosa	(+) gl	0 typ.	0 gl II auch auf Bouillonagar	0 typ.	(+)	0 gl
(+) typ.	0 m	0 typ.	(+) gl n. leichte Falten	0 typ.	0 m II gl	(+) typ.	(+) m	0 m
0 (A)	0	0	(+)	0	0	0	++	0
0 r. R.	0 r. R.	0 r. R.	0 r. R.	0 r. R.	0 r. R.	0 r. R.	(+) r. R.	0 r. R.
(+) (A)	0	0 (A)	(+)	(+) (A)	0	0	(+)	(+)
0 (A) typ.	0 typ.	0 (A) typ.	(+) typ.	(+) (A) typ.	0 typ.	0 gl	Kol. = + Z typ.	+ Z
+ (A)	0	0 (A)	+	(+) (A)	0	0	+	Kol. = ++ Z

Z = entfarbte Zone rings um die Kolonie.
A = Aufhellung des Nährbodens (= Alkalibildung).
typ = typisch runzolige Kolonie, grob zerkluftet, rauh.
m = milder zerklüftete Kolonie.
gl = Kolonie, die glatter und feuchter ist als die typisch runzelige, bes. innen im Strich.
II = Kolonie auf gleichen Nährboden weiter geimpft.

Das Auffälligste, das bei den Plattenserien beobachtet werden konnte war, daß die R-Formen (2 R, 2 RR, 3 R) auf gewissen Nährböden nicht mehr so rauh, runzlig, sondern in mehr oder minder glatter werdenden Kolonien wuchsen. Auf einigen Substraten entstanden sogar glatte, feuchtglänzende Kolonien aus den R-Varianten.

Zur Klärung der Frage, ob ein System in diesem Glatterwerden liegt, mag Tab. 2 dienen. Betrachtet man in ihr die Reihe von Stamm 2 RR, so erhellt daraus folgendes: Auf den Nährböden, die 2 RR mehr oder minder stark säuerte, neigte er zu mehr oder minder starkem runzeligen Wachstum. Auf Mannit, der stark gesäuert wurde, war besonders kräftiges runzeliges Wachstum zu sehen. Andererseits wurde das extremste glatte Wachstum auf solchen Nährböden gefunden, die entweder überhaupt nicht gesäuert wurden (Nr. 3, 4, 8, 10, 11, 14, 17), bzw. bereits durch den Zusatz der organischen Substanz entfärbt waren (Nr. 3, 8, 14), oder auf solchen, bei denen nur ganz geringe Säuerung festzustellen war. Nährböden, die ganz schwach gesäuert wurden, zeigten somit beide Wuchsformen von 2 RR. Ausnahmsweise war auf den Platten mit Arabinose- und Glycerinzusatz, die keine Säurung aufwiesen, die typische Form von 2 RR zu sehen.

Bei Stamm 2 R waren entsprechende Feststellungen zu machen,

allerdings auch wieder mit Ausnahmen. Wie 2 RR wuchs auch 2 R auf der Arabinoseplatte typisch runzlig, obwohl keine Säurung dieses Zuckers vorlag, ebenso bildete diese Variante auf der Asparaginplatte die typische R-Kolonie, ohne diese zu säuern. Dagegen zeigte sich auf allen anderen Nährböden, die nicht gesäuert wurden, die Neigung, glattere Kolonien zu bilden. Auch bei Stamm 3 R war ähnliches hinsichtlich des Glatterwerdens der Kolonien zu beobachten wie bei Stamm 2. Auf 4 Platten, die nicht gesäuert wurden (3, 4, 8, 15), war glatteres Wachstum zu sehen, bei 4 anderen dagegen (Nr. 1, 2, 10, 14) typisches rauhes. Einige Platten, die keine Säurung, z. T. sogar Alkalibildung anzeigten, wiesen ebenfalls normales runzliges Wachstum auf.

Bezüglich ihres Hämolysierungsvermögens unterschieden sich die hier behandelten Varianten nicht; Baerthlein hatte solche Unterschiede bei seinen „Mutationsformen“ von Streptococcus Höh. gefunden.

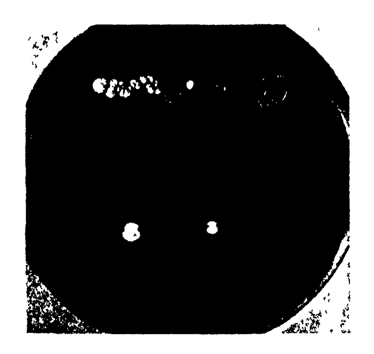


Abb. 11. Ausstrich eines Gemenges von R- und S-Formen des Micr. pyog. aur., St. 3 (½ ×).



Abb. 12. Ausstrich eines Gemenges von R- und S-Formen des Micr. roseus, St. 2 (½ ×).

Abb. 9 und 10 geben das Wachstum von 2 R auf der Maltoseplatte nach 3 bzw. 12 Tagen wieder und vermitteln einen Einblick in den Entwicklungsgang einer R-Kolonie.

Die Entstehung einer R-Strichkolonie scheint danach folgendermaßen vor sich zu gehen:

Anfänglich schlechtes Anwachsen der Kolonie, wahrscheinlich infolge von reichlichem Vorhandensein von Luftsauerstoff. Die entstehende Kolonie schließt sich nach außen hin mit einer zähen Schicht von der Luft ab. Dann erfolgt raschere Vermehrung der Zellen unter dieser Schicht, wodurch in letzterer Spannungen entstehen, die dazu führen, daß sie verschiedenst gestaltete Auswölbungen bildet oder zum Platzen gebracht wird.

R-Kolonien von Kokken neigen also dazu, auf Nährböden mit organischen Substanzen, die sie zu verwerten vermögen, vorwiegend typisch rauh zu wachsen, im entgegengesetzten Falle aber glattere bzw. völlig glatte Kolonien zu bilden.

III. Versuche mit Labkokken.

Hier interessierte vor allem die Frage, ob das Kaseinfällungsvermögen von Kokken variabel, d. h. durch irgendwelche Mittel zu beeinflussen sei.

Bei Hefen, die Milch nicht dicklegen, beobachtete Trüper, daß sie die

Koagulationsfähigkeit erlangten, wenn der Milch Dextrose hinzugefugt wurde. Trüper stellte ferner fest, daß bei Hefen, die Milch an sich schon dick zu legen vermochten, Dextrosezufuhr die Fällung beschleunigte. Ähnliches konnte er bei Hinzusetzen von Pepton beobachten. Bei Zufuhr von Dextrose + Pepton hatte er ahnliche Ergebnisse wie bei Dextrosezusatz allein; allerdings konnten 2 seiner 9 ursprünglichen nicht dicklegenden Stämme dies auch jetzt nicht. Dagegen fand er, daß die Saureproduktion in der Dextrose-Pepton-Milch am großten war; es folgte dann die Dextrose-Milchreihe und schließlich die Magermilch ohne Zusatz. Die Saureproduktion in der Pepton-Milch kam im Durchschnitt der der Magermilch gleich.

Im folgenden wurden mit Kokken ähnliche Versuche angestellt.

Von jedem zu untersuchenden Stamm wurde eine bestimmte Menge in ein Rohrchen geimpft, das 10 ccm sterile Magermilch, bzw. 10 ccm sterile Magermilch + 5% Dextrose, bzw. 10 ccm sterile Magermilch + 1% Pepton, bzw. 10 ccm sterile Magermilch + 5% Dextrose + 1% Pepton enthielt. Die Stämme wurden bei 37° bebrutet und am Tage der Dicklegung mit n/10 KOH, mit Phenolphtalein als Indikator, titriert. Die benutzte Magermilch war bei dem ganzen Versuch selbstverstandlich die gleiche.

1. Versuchsreihe. Dieser Versuch wurde zunächst mit 3, die Milch nicht dicklegenden Stämmen (2, 2 R, 2 S) durchgeführt und um eine Laktose- und eine Laktose-Peptonreihe erweitert (10 ccm Milch + 5% Laktose (+) 1% Pepton). Eine Dicklegung der Milch erfolgte aber auch nunmehr nicht; es wurde 6 Wochen beobachtet.

2. Versuchsreihe. Dieselbe Versuchsreihe wurde mit 5 Labkokken-Stämmen des hiesigen Instituts (St. W 12, W 17, T 19, T 20, T 21), sowie den frisch aus dem Euter isolierten Labkokkenstämmen Vl und Vr angestellt. Die Versuchsergebnisse sind in Tab. 3 enthalten.

Tabelle 3.

Stamm	Magermilch		Dextrose-Milch	
	dick nach Tagen	ccm n/10 KOH	dick nach Tagen	ccm n/10 KOH
Kontrolle . . .	[1])	1,6[2])	4	2,1
W 12	4	2,7	4	2,15
W 17	4	2,61	4	2,45
T 19	4	3,17	4	2,85
T 20	4	2,6	4	2,5
T 21	7	3,1	4	3,9
Vl	5	2,42	5	2,85
Vr	5	3,28	5	4,0

Stamm	Pepton-Milch		Dextrose-Pepton-Milch		Laktose-Milch	
	dick nach Tagen	ccm n/10 KOH	dick nach Tagen	ccm n/10 KOH	dick nach Tagen	ccm n/10 KOH
Kontrolle .	[1])	2,5		2,85		1,8
W 12 . . .	6	2,4	8	2,1	5	2,7
W 17 . . .	7	2,6	8	3,6	4	3,2
T 19 . . .	3	6,2	3	7,55	5	3,05
T 20 . . .	4	3,8	5	3,45	4	2,41
T 21 . . .	3	4,55	3	6,15	5	3,3
Vl	4	3,4	4	3,6	4	2,64
Vr	3	6,2	3	6,5	5	3,55

[1]) Die Kontrollen wurden am 3. Tage titriert.

[2]) Die Titrationswerte mit 4 multipliziert, ergeben annähernd Grade nach Soxleth-Henkel.

Aus der Tabelle geht folgendes hervor:

In Dextrosemilch trat die Fällung durchschnittlich gleichzeitig mit der bei Magermilch ein. Nur bei Stamm T 21 erfolgte sie 3 Tage früher[1]).

Die Titrationswerte der Dextrosereihe waren in 4 von 7 Fällen geringer als die der Magermilchreihe. Im Verhältnis zu den zugehörigen Kontrollen waren die Titrationswerte bei der Dextrosemilch in weit geringerem Maße angestiegen als bei der reinen Magermilch. (Ausnahmen T 21, V r.)

In der Peptonmilchreihe fiel ein besonders starkes Ansteigen des Titrationswertes bei 3 Stämmen (T 19, T 21, V r) auf. Indes lag, selbst bei T 19 und V r, noch keine reine Säurefällung vor. Eine solche erfolgt erst bei 26° S. H., was einem Verbrauch von ca. 6,5 ccm n/10 KOH entspräche.

In 2 Fällen waren die Dicklegungszeiten bedeutend länger als bei reiner Magermilch (W 12, W 17), bei annähernd gleichbleibenden Titrationswerten; in anderen Fällen waren sie dagegen kürzer (besonders bei T 21).

Die Dextrose-Pepton-Reihe brachte bei 3 Stämmen (T 19, T 21, V r) maximale Titrationswerte hervor. Diese betrugen — in Soxleth-Henkel-Graden ausgedrückt — ca. 26° SH für V r und ca. 30° SH für T 19; es lag also eine Säurefällung vor. Bei W 12 und W 17 waren die Koagulationszeiten wiederum auffällig lang, bei T 21 auffällig kurz.

Wie in der Peptonreihe fiel auch hier auf, daß W 12 die Milch bei einem Titrationswert (2,1) dicklegte, bei dem die Kontrollmilch (2,85) noch flüssig war.

Die Laktosemilchreihe ergab keine Auffälligkeiten; die Zeiten und Titrationswerte entsprachen denen bei der reinen Magermilch.

Zusätze von Dextrose oder Pepton oder auch von beiden waren demnach imstande,

1. die Gerinnungsfähigkeit der Milch zu beeinflussen,
2. die Gerinnungszeiten zu verkürzen oder zu verlängern.

Die Erscheinung, daß Pepton und Pepton + Dextrose besonders hohe Säuregrade ergaben, läßt vermuten, daß auch Pepton gesäuert wurde und so bei der Kaseinfällung mitwirkte bzw. als gut verwertbare N-Quelle eine starke Vermehrung hervorrief und dadurch die vorhandene C-Quelle stärker ausgenutzt, gesäuert, wurde.

Im übrigen haben schon Hueppe und Kaiser gefunden, daß Pepton der beste Stickstoffnährboden für Milchsäurebakterien ist und Orla Jensen stellte fest, daß die Milchsäurestäbchen in künstlich peptonisierter Milch wesentlich mehr Milchsäure produzieren können.

Die im Verlaufe des letzten Versuches gemachte Erfahrung, daß eine Milch bei einem Titrationswert noch flüssig war, bei dem eine andere bereits koagulierte, wurde nun näher untersucht. Wenn die Titrationsazidität also offenbar ohne Einfluß auf die Labfällung durch Labkokken war, so sollte jetzt der Einfluß der aktuellen Azidität, des p_H, geprüft werden.

Nach der herrschenden Ansicht ist für eine Enzymwirkung die Wasserstoffionenkonzentration maßgebend und nicht die Titrationsazidität. So nimmt auch van Dam auf Grund seiner Versuche mit künstlichem Lab an, daß die Schnelligkeit, mit der die Labwirkung eintritt, eine Funktion der vorhandenen Menge Wasserstoffionen ist. Im Gegensatz zu van Dam

[1]) Bei der Feststellung der Koagulationszeiten konnten sich dadurch geringe Differenzen ergeben, daß die Milchröhrchen nur während der Dienstzeit des hiesigen Instituts (8—15 Uhr) auf Dicklegung hin untersucht wurden.

vertreten Grimmer, Krüger und Rudzik die Meinung, daß die Labgerinnungsgeschwindigkeit eine Funktion der Titrationsazidität ist, daß die Gerinnungsgeschwindigkeit in geringerem Maße ansteigt als die H-ionenkonzentration.

3. Versuchsreihe: Zur Prüfung dieser Frage wurde ein neuer Versuch angesetzt, bei dem neben der Titration eine p_H-Bestimmung gemacht wurde. Es wurde nicht wie im vorigen Versuch nur je ein Röhrchen einer Milch beimpft, sondern gleichzeitig zwei, wobei das zweite die gleiche Milch- und Einsaatmenge wie das erste enthielt. Auf diese Weise gelang es, die Milch zweier Röhrchen immer gleichzeitig zum Gerinnen zu bringen. Im Zeitpunkt der völligen Gerinnung wurde das eine Röhrchen mit n/10 Kalilauge titriert und von dem anderen elektrometrisch der p_H gemessen. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

Tabelle 4.

Stamm	Magermilch			Dextrose-Milch		
	dick nach Tagen	ccm n/10 KOH	p_H	dick nach Tagen	ccm n/10 KOH	p_H
Kontrolle	[1])	1,95	6,38		2,4	6,28
W 12	5	3,25	5,68	4	2,75	5,67
W 17	5	3,6	5,76	4	3,3	5,76
T 19	5	4,3	5,48	4	4,1	5,5
T 20	5	3,9	5,76	5	3,2	5,83
T 21	6	4,4	5,12	5	5,1	5,24
V r	4	4,3	5,38	3	4,3	5,5
V l	4	3,0	5,79	5	3,4	5,88

Stamm	Dextrose-Pepton-Milch			Pepton-Milch		
	dick nach Tagen	ccm n/10 KOH	p_H	dick nach Tagen	ccm n/10 KOH	p_H
Kontrolle	[1])	3,05	6,21		2,6	6,4
W 12	8	2,9	5,46	6	2,59	5,18
W 17	8	4,3	5,4	7	2,8	6,07
T 19	2	7,1	5,0	2	7,0	5,07
T 20	4	4,1	5,86	4	4,0	6,0
T 21	2	8,0	5,1	2	5,5	5,07
V r	2	6,5	5,07	2	6,0	5,36
V l	6	4,85	5,62	4	3,4	5,82

Stamm	Pepton-Laktose-Milch			Laktose-Milch		
	dick nach Tagen	ccm n/10 KOH	p_H	dick nach Tagen	ccm n/10 KOH	p_H
Kontrolle	[1])	2,6	6,33		1,8	6,34
W 12	5	3,65	5,7	5	2,85	5,8
W 17	11	4,2	5,34	4	3,3	5,76
T 19	2	6,0	5,07	4	4,3	5,3
T 20	4	3,65	5,86	6	3,1	5,7
T 21	2	5,5	5,12	6	4,2	5,88
V r	2	5,55	5,31	5	4,9	5,34
V l	4	3,8	5,93	4	3,2	5,58

[1]) Die Kontrolle wurde am 5. Tage untersucht.

Aus der Tabelle geht hervor, daß die Titrationswerte denen der zweiten Versuchsreihe entsprachen. Besonders auffällig war, daß die Stämme T 19, T 21 und V r trotz hoher Säuregrade geringere p_H-Werte ergaben.

Die unterschiedlichen Dicklegungszeiten im zweiten und dritten Versuch sind nicht weiter beachtlich, da verschiedene Milchsorten benutzt wurden.

Die p_H-Werte waren im Zeitpunkt der Koagulation stets kleiner als die der Kontrollmilch mit dem geringsten p_H (6,21). Während in dem wiederholt genannten Fall von W 12 festgestellt wurde, daß die Titrationsazidität bei der Koagulation gefallen war, konnte bezüglich der aktuellen Azidität ein Ansteigen beobachtet werden.

Daraus ist zu schließen, daß der aktuelle und nicht der potentielle Säuregrad auf das Wirksamwerden des Labenzyms von Einfluß ist.

IV. Bakterizidieversuche.

Maßgebend für die Vornahme dieser Versuchsreihe war einerseits die Erkenntnis von Drewes, daß die Wirkung der Bakterizidie der Milch durch Zusatz von Säuren verstärkt und durch Alkalizusatz herabgesetzt wurde, und andrerseits die bei den Labkokken gemachte Erfahrung, daß Zusatz von Pepton zu Milch geeignet ist, ihren Säuregrad zu erhöhen. Es erhob sich also die Frage, ob auch durch Zusatz von Pepton zu roher Milch die bakterizide Kraft derselben erhöht würde, in ähnlicher Weise wie durch direkten Zusatz von Säure.

Die angewandte Methodik richtete sich in ihren Grundzügen nach der von Drewes aufgestellten: Es wurde unter den weiter oben beschriebenen sterilen Kautelen aseptische Milch gewonnen und dieselbe sofort in einem mit Eisstückchen beschickten Wassergefäß abgekühlt. Sodann wurde in 4 sterile Röhrchen je 10 ccm Milch pipettiert und in zwei hiervon noch 1%, in Wasser gelöstes, Pepton hinzugefügt.

Hierauf wurde eine unbehandelte Milch und eine mit Peptonzusatz durch 4 Min. langes Erhitzen auf 80° ihrer bakteriziden Kraft beraubt und abgekühlt; diese beiden Röhrchen mit inaktivierter Milch dienten im Versuch als Kontrolle. Alle 4 Röhrchen wurden dann in einem Wasserbade auf die Versuchstemperatur von 37° C gebracht. Nun wurden zunächst Keimplatten von den 4 Milchröhrchen unter Zuhilfenahme von Verdünnungsflaschen hergestellt. Sofort anschließend wurde von einer, in einer Verdünnungsflasche hergestellten, homogenen Wasseraufschwemmung des zu untersuchenden Kokkenstammes eine bestimmte geringe Menge in die 4 Röhrchen einpipettiert. — Die Kokken entstammten einer 24 stündigen Magermilchkultur. — Nach Beimpfen und kräftigem Durchschütteln der Milchröhrchen wurden auch von diesen Keimplatten angelegt und nun die Röhrchen bei Versuchstemperatur bebrütet. Nach Ablauf von 2 Std. wurden dann abermals — nach vorherigem Schütteln der Röhrchen — Keimplatten hergestellt und die Röhrchen weiter bebrütet. Dieses Verfahren wurde nach weiteren 2, 4 und 6 Std. wiederholt.

Als Versuchsstamm wurde zunächst der oben bereits benutzte Labkokkus T 21 benutzt. Tabelle 5 gibt die Ergebnisse des ersten Bakterizidieversuches wieder:

Tabelle 5.

Zeit der Probeentnahme	Keimzahl pro ccm		Keimzahl pro ccm	
	Milch roh	Milch roh + Pepton	Milch inakt.	Milch inakt. + Pepton
sofort	60 000	55 000	68 000	40 000
nach 2 Std.	80 000	60 000	125 000	122 000
,, 4 ,, ...	75 000	90 000	335 000	295 000
,, 6 ,, ...	105 000	240 000	1 700 000	1 100 000
,, 8 ,, ...	220 000	2 000 000	8 000 000	8 000 000

Ausgangsmilch: roh = 500 Keime; inaktiv = 0 Keime.

Die Tabelle 5 zeigt, daß die benutzte Rohmilch bakterizide Kraft besaß; denn nach 4stündiger Bebrütung wurde noch eine Keimzahl, die nur verhältnismäßig wenig von der Anfangskeimzahl abwich, ermittelt (vgl. Spalte: Milch roh). Die zugehörige inaktivierte Kontrollmilch bewies dies endgültig, da man bei ihr bereits nach 2 Stunden ein bedeutendes Anwachsen der Keimzahl feststellen konnte, was sich bei längerer Bebrütungsdauer immer mehr verstärkte. — Es sei hier noch erwähnt, daß die benutzte Milch aus dem gesunden Viertel einer auf drei Eutervierteln an Mastitis erkrankten Kuh stammte. —

Aus Tabelle 5 geht weiter hervor, daß auch die mit Pepton versetzte Rohmilch bakterizide Kraft besaß. Wie die Spalte „roh + Pepton" zeigt, war die Keimzahl nach 2 Stunden zwar um ein geringes angestiegen. Daß dies aber keine normale Vermehrung, sondern eine durch die Bakterizidie der Milch gehemmte war, erhellt daraus, daß die inaktivierte, mit Pepton versetzte Milch sofort einsetzende und schnell fortschreitende starke Keimvermehrung aufwies. Die bakterizide Phase der Rohmilch mit Peptonzusatz war als bis über 4 Stunden reichend anzusehen; denn bis zu 4 Stunden war die Keimvermehrung im Vergleich mit der inaktivierten Peptonmilch stark gehemmt. Nach 6 Stunden war sämtliche bakterizide Kraft der Milch verbraucht, und das Pepton schien von nun ab besonders wachstumsfördernd zu wirken. Das zeigte ein Vergleich mit der unbehandelten Rohmilch, deren Keimzahl noch nicht einmal die Hälfte der Keimzahl bei der inaktivierten Milch erreicht hatte.

Es ist also festzustellen, daß ein Zusatz von Pepton zu roher Milch der Bakterizidie derselben während der ersten 4 Stunden schwach entgegenwirken konnte. Von da ab förderte das Pepton das Wachstum der Kokken stark, was besonders aus der Spalte „inakt. + Pepton" zu ersehen ist.

Ein zweiter Versuch wurde mit dem oben mehrfach erwähnten gelborange gefärbten Mikrococcus-Stamm 3, der einige Monate in Peptonwasser gehalten war, angesetzt. Die Tabelle 6 gibt die Ergebnisse dieses Versuches wieder.

Tabelle 6.

Zeit der Probeentnahme	Keimzahl pro ccm		Keimzahl pro ccm	
	Milch roh	Milch roh + Pepton	Milch inakt.	Milch inakt. + Pepton
sofort	83 000	20 000	10 000	3 000
nach 2 Std.	82 000	20 000	110 000	55 000
„ 4 „	130 000	120 000	200 000	160 000
„ 6 „	1 200 000	700 000	450 000	700 000
„ 8 „	7 000 000	6 000 000	∞	∞

Ausgangsmilch roh, Keimzahl = 5200; Ausgangsmilch inaktiv, Keimzahl = 0.

Daß auch die in diesem Versuch benutzte Milch bakterizide Eigenschaften besaß, geht aus der Spalte „Milch roh" hervor: nach 2 Stunden war der Keimgehalt kleiner als die Einsaatmenge. Die inaktivierte Milch hingegen hatte sich in diesen 2 Stunden bereits um mehr als das Zehnfache vermehrt. Die mit Pepton versetzte Rohmilch zeigte nach 2 Stunden denselben Keimgehalt wie zur Zeit der Einimpfung. Bei der mit Pepton versetzten inaktivierten Milch war dagegen eine Vermehrung des Keimgehaltes auf fast das 20fache zu verzeichnen. Nach 6 Stunden hatte die Keimzahl

bereits eine Höhe erreicht, die größer war als die der inaktivierten Milch ohne Zusatz, obwohl deren Einsaat über 3mal so groß war.

Aus diesen Tatsachen ist also ebenfalls zu ersehen, daß der Peptonzusatz nicht geeignet war, die Bakterizidie der Rohmilch während der ersten beiden Stunden der Bebrütung zu unterdrücken. Nach 4 Stunden jedoch hatte die peptonhaltige Milch nicht nur ihre bakterizide Kraft verloren, sondern sie erwies sich auch hier wieder als besonders günstiger Nährboden für die Kokken, was der Sprung der Keimzahl von 20 000 auf 120 000 ausdrückte.

Der Labcoccus des ersten und der Luftcoccus des zweiten Versuchs verhielten sich also peptonhaltiger Rohmilch gegenüber grundsätzlich gleich: In der Peptonmilch wurde ihre Vermehrung einige Stunden hintangehalten, daran anschließend aber stark gefördert.

Es interessierte nun weiter, auch den Säuregrad während der einzelnen Versuchsphasen zu beobachten. In einem dritten Bakterizidieversuch wurde daher gleichzeitig mit jeder Abimpfung eine p_H-Bestimmung vorgenommen (vgl. Tab. 7).

Tabelle 7.

Zeit	Rohmilch ohne Zusatz		Rohmilch + Pepton		Inakt. Milch ohne Zusatz		Inakt. Milch + Pepton	
	Keimzahl	p_H	Keimzahl	p_H	Keimzahl	p_H	Keimzahl	p_H
Unbeimpfte Milch								
sofort	800	6,89	800	6,93	0	6,93	0	6,89
„	154 000	6,89	125 000	6,93	160 000	6,93	160 000	6,89
nach 2 Std. . .	138 000	6,91	136 000	6,76	230 000	6,93	280 000	6,90
„ 4 „ . .	160 000	6,9	400 000	6,92	400 000	6,89	700 000	6,82
„ 6 „ . .	190 000	6,56	720 000	6,61	680 000	6,82	1 000 000	6,7
„ 8 „ . .	1 210 000	6,35	3 500 000	6,21	1 500 000	6,34	4 000 000	6,26

Aus Tabelle 7 sieht man zunächst wieder, daß Peptonzusatz zu roher Milch deren bakteriziden Kraft anfangs nur wenig entgegenwirkte, aber schon nach 4 Stunden die Vermehrungsfähigkeit der Kokken so stark förderte, daß die Bakterizidie ausgeschaltet wurde. Ferner war wieder zu erkennen, daß Pepton in inaktivierter Milch als günstiger Nährboden eine starke Vermehrung der Kokken ermöglichte. Über die p_H-Werte zu den einzelnen Abimpfungszeiten geht aus Tabelle 7 folgendes hervor:

In der inaktivierten Milch nahm die aktuelle Azidität mit steigender Keimzahl zu, der p_H wurde also kleiner. Auch in der inaktivierten Milch + Pepton nahm der p_H mit steigender Keimzahl ab; er erreichte nach 8 Std. — entsprechend der höheren Keimzahl — einen um 0,08 niedrigeren p_H als die reine inaktivierte Milch.

In der reinen Rohmilch sah man ebenfalls ein Abfallen der p_H-Werte; während der bakteriziden Phase hatte der p_H einen annähernd unveränderten Wert.

Bei der pepton-haltigen Rohmilch wichen der sofort und der nach 8 Stunden bestimmte p_H am stärksten voneinander ab, wie auch die entsprechenden Keimzahlen stark differierten. Als Auffälligstes ergab sich in diesem Versuch die Feststellung, daß bei geringer Keimzahlvermehrung der p_H während der bakteriziden Phase vorübergehend einen so niedrigen Wert angenommen hatte, wie ihn die übrige Milch erst nach rund 6 Stunden erreichte. Auf dieses Absinken des p_H folgte dann noch einmal ein kurzes

Ansteigen desselben. Zur Erklärung dieser Erscheinung wäre vielleicht anzunehmen, daß die bakteriziden Substanzen während der Dauer ihrer Wirksamkeit die Kokken zur Säuerung von Pepton anregen könnten. Da andererseits aber Pepton die Vermehrungsfähigkeit der Kokken förderte, ist erklärlich, daß der Keimgehalt während der bakteriziden Phase annähernd gleichblieb.

V. Zusammenfassung.

Es wurden 36 Kokken-, Tetraden- und Sarzinenstämme aus den verschiedensten Fundorten isoliert und ihre wichtigsten kulturellen, morphologischen und physiologischen Eigenschaften festgestellt.

Mit den Stämmen wurden Variationsversuche vorgenommen. Zu diesem Zwecke wurden sie den verschiedensten Vorbehandlungen unterworfen. Das ursprüngliche Ziel, Kokken in Stäbchen zu verwandeln, wurde nicht erreicht. Dagegen wurden kulturelle, physiologische und lediglich vorübergehende morphologische Abweichungen bei den Stämmen festgestellt.

Durch LiCl-Behandlung konnten vorübergehende Änderung der Koloniefarbe, vorübergehend „Hungerformen" mit kleinerwerdenden Zellen und eine R-Form erzielt werden.

Peptonzusatz brachte bei einem rosafarbenen Micrococcus eine weiße Farbvariante hervor.

Nach Erhitzung der Stämme traten vorübergehend unregelmäßige Zellformen und Änderung der Koloniefarbe auf. In einem Falle wurde durch Erhitzung eine R-Form erzielt. Wiederholungen der Erhitzungen ergaben eine Abnahme der Hitzeresistenz.

Vorbehandlung mit Ammoniak ergab in einem Falle eine R-Form. In anderen Fällen wuchsen anders gefärbte Kolonien, die sich aber nicht auf andere Nährböden übertragen ließen. Ein Sarcina lutea-Stamm zerfiel in große Einzelkokken und kleine Sarzinen.

Durch Karbolsäurezusatz konnten vorübergehend unregelmäßige Zellformen hervorgerufen werden. Mit Karbolsäure behandelte Stämme wurden in ihrer Vermehrungsfähigkeit gehemmt.

Vorbehandlung mit Kochsalz rief in 2 von 14 Fällen R-Formen hervor.

Vorbehandlung mit Arsentrioxyd ergab bei einem Sarcina lutea-Stamm unregelmäßige Zellformen, u. a. Einzel- und Diplokokken.

Aufbewahren in sterilem Wasser oder auf sterilem Stroh, sowie Vorbehandlung mit Milchsäure, vermochten keine Veränderungen hervorzurufen.

Durch Vorzüchtung in Leber-Leberbouillon konnten von einem gelb-orangefarbenen Micrococcus eine R- und eine anders gefärbte S-Form erzielt werden.

Eine Nachprüfung der physiologischen Eigenschaften der vorbehandelten Stämme wies nur in verhältnismäßig wenigen Fällen eine Abweichung von denen der Ausgangsstämme auf.

Die erzielten R- und S-Formen sowie die Ausgangsformen wurden näher untersucht. Auf Nährböden mit gewissen organischen Substanzen, die sie gut verwerten konnten (Säuerung), neigten R-Kolonien dazu, glatter bzw. völlig glatt zu wachsen.

Die Farbvarianten wurden näher studiert. In den Kolonien der weißen Variante eines rosafarbenen Mikrokokkenstammes wurde das

Auftreten von rosa Sektoren festgestellt und weiter verfolgt. Die heller gefärbte S-Form eines gelb-orangefarbenen Mikrokokkenstammes bildete unter bestimmten Ernährungsbedingungen rauhe Kolonien.

Mit Euterkokken wurden Versuche unternommen, die Kaseinausfällung bei Milch durch Zusätze zu beeinflussen. Die Gerinnungszeiten sowie die potentielle und aktuelle Azidität im Zeitpunkt der Dicklegung konnten durch Zusätze von Dextrose, Pepton oder Laktose beeinflußt werden.

In verschiedenen Bakterizidieversuchen wurde Zusatz von Pepton auf die bakterizide Kraft von Rohmilch untersucht: Peptonzusatz zu Rohmilch wirkte stark keimvermehrend. Die Wirkung der Bakterizidie wurde dadurch stark unterdrückt; insbesondere nahm die Dauer der bakteriziden Phase ab.

Es ist mir eine Ehrenpflicht, am Schlusse dieser Arbeit meines kürzlich verstorbenen hochverehrten Lehrers, Herrn Prof. Dr. W. Henneberg, für die Überlassung des Themas, sowie für das Interesse und die Unterstützung während der Arbeit in Dankbarkeit zu gedenken.

Literatur.

Allemann, O., Die Bedeutung der Wasserstoffionen für die Milchgewinnung. (Bioch. Ztschr. 1912. S. 45.) — Arkwright, J. A., Journ. of Path. Vol. 24. 1921. p. 36. — Baerthlein, K., Über Mutationserscheinungen bei Bakter. in: Arbeiten a. d. kaiserl. Gesundh.-Amt. 1912. — Baerthlein, K., Über die bakterielle Variabilität, insbesondere sog. Bakt.-Mutationen. (Zentralbl. f. Bakt. Orig. 1918. S. 81.) — Baumann, J., Untersuchungen über die milchw. wicht. Bakt. in den Faeces des Rindes. (Diss. 1934.) — Bergeys, Manual of Determinative Bacteriology. 1928. — Van Dam, W., Über den Einfluß der Milchsäure auf die Milchsäure-Gärung. (Bioch. Ztschr. 1918. S. 87.) — Van Dam, W., Beitrag zur Kenntnis der Labgerinnung. (Ztschr. f. physiol. Chemie. Bd. 58. 1909.) — Drewes, K., Über die Bakterizidie der Milch. (Diss. Kiel. 1927.) — Fleischmann-Weigmann, Lehrbuch der Milchwirtschaft. 1932. — Griffith, zit. bei Neufeld, Pneumokokken. — Hajos, K., Gelungene Umzüchtung des Staphyloc. aur. in Sta. citr. (Ztschr. f. Bakt., Orig. Bd. 94. 1925.) — Grimmer u. Krüger, Milchw. Forschg. Bd. 2. 1925. — Grimmer u. Rudzik, Beiträge zur Kenntnis der Labwirkung II. (Milchw. Forschg. Bd. 3. 1926.) — Hadley, Ph., Microbic. Dissociation. (Journ. of Inf. Diseas. Vol. 40. 1927.) — Henneberg, Untersuchung über ungewöhnliche Zellformen bei einem „Wasserbakterium" aus der Alcaligenes-Gruppe. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 86. 1932.) — Henneberg, Die Gewinnung und der Keimgehalt „aseptischer" Milch. (Sonderabdruck aus d. Festschrift „Zehn Jahre preuß. Versuch- u. Forschg.-Anstalt f. Milchwirtsch." 1932.) — Henneberg, Über die Bakterien im gesunden Kuheuter. (Molk.-Zeitg. Hildesh. 1932.) — Hueppe u. Kaiser, zit. bei Fleischmann-Weigmann, S. 228. — Hüttig, C., Der Strept. lactis (Lister) Löhnis, eine Form des Bact. herbicola B. et D. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 84. 1931.) — Hüttig, Milchw. Forschg. Bd. 12. 1932. S. 455 ff. — Hüttig, C., Neue Anschauungen über die Entwicklungsmöglichkeiten bei Bakt. (Molk.-Zeitg., Hildesheim. 1932.) — Orla-Jensen, The Lactic acid Bacteria. (Kopenhagen. 1919.) — Karström, H., Diss. Helsinki 1930. (Zit. bei Virtanen.) — Klimmek, F., Über den Pleomorphismus bei Sarcina flava. (Diss. Königsberg 1931.) — Klingmüller, Untersuchungen über Unterschiede des Str. cremoris und Strept. mastitidis. (Diss. 1930.) — Kruse, Veränderlichkeit und Formenwechsel bei Bakterien. (Ztschr. f. Hyg. u. Inf. Bd. 115, 1. Heft. 1933.) — Kuhn, Ph., Med. Klinik Nr. 20. 1930. — Kuhn, Ph. u. Sternberg, K., Über Bakterien und Pettenkoferien. (Zentralbl. f. Bakt., Orig. Bd. 121. 1931.) — Lehmann-Neumann, Bakteriologie I. Bd., II. Bd. 1927. — Löhnis, Life cycles of the Bacteria. (Washington 1922.) — Lubinsky, zit. bei Neumann, R., Arch. f. Hyg. Bd. 30. 1897.) — Matzuschita, T., Die Einwirkung des Kochsalzgehaltes des Nährbodens auf die Wuchsform der Mikroorganismen. (Ztschr. f. Hyg. Bd. 35. 1900.) — Neufeld u. Schnitzer, R., Pneumokokken. (Handb. d. path. Mikr. Bd. 4. 2. Teil. 1928.) — Neumann, R., Studien über

die Variabilität der Farbstoffbildung bei Microc. pyog α aureus (Staph. pyog. aur.) und einige andere Spaltpilze. (Arch. f. Hyg. Bd. 30. 1897.) — Schmidt-Kehl, Ludwig, Der Formenwechsel der Sarzinen. (Arch. f. Hyg. Bd. 103. 1930.) — Schmidt, Helmut, Über Dimorphie bei Milzbrand-, Wurzelbacillen und Sarcinen. (Ztschr. f. Hyg. u. Inf. Kr. Bd. 115. Heft 1. 1933.) — Schubert, O., Über Koloniebildung der Bakterien. (Zentralbl. f. Bakt., Orig. Bd. 84. 1920.) — Smit, J., Die Gärungssarcinen. (Kolkwitzsche Sammlung f. Pflanzenforschg. Heft 14. 1930.) — Steck, Die latente Infektion der Milchdrüse. Hannover 1930. — Stolze, Pathogene Mikrokokken in der Milchwirtschaft unter besonderer Berücksichtigung der physiologischen Eigenschaften. (Diss. Kiel 1930.) — Stubenrath, F. C., Das Genus Sarcina. Habilitationsschrift 1897. — Trüper, Über Milchzucker vergärende Hefen der Rohmilch. (Diss. Kiel 1928.) — Virtanen, A., Biochemie der Bakterien. (Ann. Acad. Scient. Fennicae. 1933.) — Werner, G., Veränderungen der Bakt. durch längeren Aufenthalt im Wasser. (Ztschr. f. Hyg. u. Inf.-Kr. Bd. 115. 1. Heft.)

On the Relation between the Salmon Hatching and the Bacterial Content of the Feeding Water.[1]

[From the Institute of Applied Mycology, College of Agriculture, Hokkaido Imperial University, Sapporo, Japan. (Director Prof. Dr. Jun Hanzawa.)]

By **Sh. Takeda.**

With 1 figure in the text.

Introduction.

The artificial culture of salmon is a notable enterprise undertaken for the public benefit and the annual result always has a great influence upon the salmon catch after several years. Therefore, in respect to the salmon fishery this artificial culture is never neglected. It is the feeding water that is the most important in its relation to the artificial culture. The water claimed as suitable is clear, chill and fresh one which contains no poisonous substances and it is rich in dissolved oxygen, but nothing is taken into consideration regarding the quality of the water from the bacteriological standpoint. As the water is from natural sources, bacteria are naturally contained in it and also it is supposed that the hatching of salmon eggs is affected if the bacterial content is large. No study on the bacterial content of the water has ever been reported. The author was requested to undertake the bacteriological investigation of the disease which had caused very heavy losses at the Nishibetsu (lately its name was changed to Nijibetsu) Hatchery in the spring of 1928, by the Hokkaido Fishery Experimental Station and the chance to study the bacterial content of the water used by this salmon hatchery was accepted. The results of the investigation will be reported herein.

Acknowledgment: The author wishes to express his sense of gratitude to Prof. Dr. Jun Hanzawa, Mrs. I. Moriwaki, formerly director of the Hokkaido Fishery Experimental Station, J. Utsumi, formerly director of the Nishibetsu Hatchery, and to K. Kikuchi, formerly director of the Chitose Hatchery, for their kind suggestions and aid.

---

[1]) The investigation reported in this paper is published with the permission of the Director of the Hokkaido Fishery Experimental Station.

State of Damage at Nishibetsu Hatchery and Appearance of the damaged Eggs.

In the spring of 1928 very heavy losses were caused by a peculiar condition of the eggs at the Nishibetsu Hatchery which was established on the upper stream of the Nishibetsu River which empties into Nemuro Bay, in 1890, but according to later investigations the same damage seemed to exist at many other hatcheries in Hokkaido (1). This disease led to consternation on the part of those engaged in the spread of salmon propagation.

The heavy losses of salmon eggs in Hokkaido in the past occurred at the Yûrappu and Shiribetsu Hatcheries. Early in this century the damage at the Yûrappu Hatchery was said to be caused by the larva of a certain kind of Diptera. The loss was stopped by the reformation of the source of the feeding water. The Shiribetsu Hatchery was embarrassed by the heavy damage which was caused by unknown bacteria for the four years from 1922 to 1925 (2) and they got rid of the damage which seemed to be the same as at Nishibetsu, by changing the feeding water from spring water of high temperature to river water of low temperature. The common and usual damage at the hatcheries is caused by the growth of water molds but it is relieved by the removal of the dead eggs. There are explosion, chromogenous bacterial and white spot diseases (krankhaftes Aufplatzen, Erkrankungen durch chromogene Bakterien und Fleckenkrankheit) (3) on the eggs, besides the above diseases but these damages seem to be not so heavy. There is another disease called the soft-egg disease which has caused very heavy losses at a number of commercial hatcheries in New England (4). This disease resembles to the condition of eggs which happened at the Nishibetsu Hatchery.

The damage which happened at the Nishibetsu Hatchery was considered very heavy and the disease was believed to be due to peculiar condition of the eggs resulting from deterioration in the egg-membrane, caused by some kind of bacteria. The disease was first discovered in the eggs in the troughs neighboring to the 139th trough on the 5th or 6th February, 1928. Now if the spawning dates, the dates when the eyespot became distinctly visible and the hatching dates are recorded according to the "Progress of Work in 1927" and moreover if the days from the spawning day up to the hatching day are calculated, the following table is obtained:

Duration of the egg Stage in 1927, Nishibetsu Hatchery.

No. of Trough	Spawning Date	Date when Eye-spot became visible	Hatching Date	Duration of the egg Stage (days)
1—68	Oct. 6—Nov. 21	Nov. 6—Dec. 22	Dec. 7—Jan. 22	63
69	Nov. 21—23	December 22—23	Jan. 22—23	62—63
70—95	23—28	23—28	23—28	62
96—104	December 3	January 1	31	60
105—144	Dec. 8—Jan. 2	6—31	Feb. 4—29	59

The 145th and following troughs were omitted, for the eggs were very badly damaged.

It is evident from the table that in this business year the duration of the egg stage was 63 days at the beginning and was gradually shortened as the winter advanced when the water temperature was descending, and at last the duration of the egg stage became only 59 days for the eggs which

were taken after the 3rd December; that is, the duration was shortened four days. At the Nishibetsu Hatchery the temperature of the feeding water had never been taken, but that of the inspecting water for the eggs (at this hatchery the feeding and inspecting waters were not the same) during the business term was as the following shows:

Temperature of the Inspecting Water during the Business Term at the Nishibetsu Hatchery. (Average of temperatures in 1924 and 1925.) (C°.)

Aug.	Sept.	Oct.	Nov.	Dec.	Jan.	Feb.	Mar.	Apr.	May
9.7	9.8	9.7	9.2	8.9	8.5	8.7	8.8	9.2	9.5

As the feeding water would be spring water out of the same source that the inspecting water gushed out from, the water temperature of the former should have the same seasonal change although it would not be equal to that of the latter. If this be so, it would be normal for the duration to be short in the beginning of the business term then to elongate gradually as the term advances and again to shorten as the end of the term comes on. At this hatchery the change of the duration had followed this course up to the 1926 business year, but in the 1927 there was such a strange phenomenon as the above. It was probably the first damaged eggs that were taken on the 23rd November that had this shorter duration of the egg stage. Moreover the eggs which were taken after the 8th December and had the 4-day-shortened duration, must have been plainly damaged. One of the hatchery employees said that, when the eggs were stirred up on about January 20 for the removal of unfertilized eggs, he felt a different turgidity in the egg mass from that characteristic of normal eggs. Therefore, at that time the damage must have already existed in the eggs which were received into the troughs neighboring to the 120th trough and taken on the 15th and 19th December, but the damage was not yet so heavy as to kill the eggs. At last about the 5th or 6th February, among the eggs received in the troughs neighboring to the 139th trough many dead and damaged eggs were found. If the results of the hatching of the eggs in the 10 troughs neighboring to the 139th trough are considered and if the calculated ratio of the number of eggs which died before the eye-spot was visible and those which died after the eye-spot was visible are compared, citing as material proof from the "Progress of Work in 1927", the results are shown in the following table:

Ratio of Eggs which died after the Eye-spot became visible to the ones which died before the Eye-spot became visible. (Each trough received 100,000 eggs.)

Trough	Spawning Date	Date when Eye-spot became visible	Hatching Date	Dead Eggs before Eye-spot became visible	Dead Eggs after Eye-spot became visible	Ratio of two kind of dead Eggs
137	Dec. 23	Jan. 21	Feb. 19	2,157	2,942	1.36
138	23	21	19	3,335	3,834	1.15
139	23—28	21—26	19—24	2,255	3,706	1.64
140	28—30	26—28	24—26	2,518	7,253	2.88
141	30	28	26	1,850	4,562	2.47
142	30	28	26	1,316	6,537	4.96
143	30	28	26	2,351	7,288	3.10
144	Jan. 2	31	29	1,030	4,673	4.54
145	2	31	29	2,500	27,500	11.00
146	2	31	29	2,133	21,167	9.92

That in each trough more eggs died after the eye-spot was visible than before the eye-spot became visible was abnormal and showed that some disease had attacked the eggs. In the previous business year of 1926, the ratio of the eggs which died after and before the eye-spot became visible, was 0.95 (2,551,779 to 2,695,712 eggs); but in 1927 the ratio gradually increased, and the heavier the damage, the larger the ratio. The cause of this damage was not due to the eggs themselves, because when the same kind of eggs were received at the Pombetsu Hatchery the fry hatched normally. Therefore, the cause must be due to the feeding water, which was examined from both the chemical and bacteriological standpoints. It was evident that the quality of the water was fit for the embryo development in respect to temperature, hydrogen ion concentration and soluble oxygen as reported (5). But the characteristic turgidity was destroyed as the membrane perforations in the damaged eggs increased in number. If a section of the damaged egg-membrane was microscoped, the egg-membrane was seen to be concave. Hanzawa and others (6, 7) observed many bacteria at the concave parts. There was no doubt from these facts that the disease was not caused by the chemical quality of the water but by the bacteria which digested the membrane in small localized areas, thus making the eggs soft and flaccid. Where did such bacteria come from? Certainly they came from the water. Accordingly the sorts and number of bacteria contained in the water were investigated.

Bacterial Content of the Feeding Water.

In the middle of April, 1928, the feeding and inspecting waters were investigated first of all. For sampling, sterilized test-tubes were used. The sampled waters are briefly described as the following shows:

I (Source). Spring water (at that time mixed with water coming from the thawing snow) spouted forth here and there and stood forming a swamp from which a little brooklet ran towards the first reservoir, but the brooklet entered for about 40 m. a closed gutter before it reached the reservoir. The sampling was carried out at the entrance.

II (Frist reservoir). This reservoir was a large polygonal pond, formed by two rectangular ponds situated side by side (one contained about 1.7 are, and the other 0.7 are) which had a roof. The depth of the water was about one meter. Sampling was carried out at the corner.

III (Second reservoir). This reservoir where water was drawn by means of a wooden conduit-pipe from the first reservoir was a 0.8 are roofed rectangular pond with a depth of about one meter. Sampling was carried out near the entrance of the wooden conduit-pipe by which the water was drawn to the hatching house.

IV (Supply-trough in the hatching house). The water in the supplytrough at the hatching house was that which was drawn by means of the wooden conduit-pipe from the second reservoir.

V (Water which had passed through the diseased eggs). In the first trough there were two egg-trays in each of which there were about one hundred eggs which had some thing white about them, received as diseased eggs, and also a stack which received about 8,000 eggs as the fifth examination [hereafter what are described as the ". . . th examination eggs" indicated those used by the other investigators (7)]. In the second trough the eggs which had been damaged and died, had been received, but were not there at the time of the writer's bacteriological examination. In the 3rd trough there were three stacks one of which contained the 6,000 sixth examination eggs which had died several days before, another one contained 2,500 eggs whose eyes did not color and the other one contained 5,000 eggs whose eyes became black; the two latter had been transported from the Pombetsu Hatchery two days before. In the fourth trough there were no eggs and shallow water flowed over the bottom. The water which fell down from the 4th trough into the drain was also sampled.

VI (Water which passed through sound eggs). The sample was taken from the water which fell down from the 5th trough to the 6th. This water flowed out from the supply-pipe into the 5th trough and flowed on through the 5th trough which now contained the same eggs that had been in the 3rd trough.

VII (Inspecting water). At the Nishibetsu Hatchery the inspecting water was different from the feeding water. The source of the former was a little wooden framed pool (1.3 m. × 1.0 m.), into which the water gushed vigorously, situated at the northern outside corner of the hatching house. The pool had a wooden cover and its water was 30 cm. in depth. At one corner of the pool were the seventh examination eggs. The water temperature was 8°. (The temperature of the other waters was about 8—9°.)

As soon as the waters were sampled the gelatin plate cultures were made by using one cc. of original, tenth-, hundredth- or thousandth-diluted samples. The plates were placed in the hatching trough at a temperature of about 8° for four days. And the bacterial number in one cc. of each sample was calculated from the grown colonies.

At the end of May the feeding water, the spring waters and the river water at the Nishibetsu Hatchery were again investigated. For sampling use was made of Esmarch's apparatus, sterilized bottles or test-tubes according to the conditions of the places. The samples were treated as before, but the plate cultures were incubated for 5 days at room temperature at this time as the air temperature ascended.

Sampled waters may be briefly described as follows:

1. "Osoüsu" Source (Pool).

An upland lies to the south-west from the hatching house, in which upland 30 m. distant from the hatching house there is a hollow, 25 m. in diameter, where spring water gathers in a pool. It is called "Osoüsu". Its outlet is at the south-east and forms the "Osoüsu" River. Into the pool several large trees had fallen, water-plants grew all over the pool excepting in the central part and purple bacteria (Chromatium) also grew, coloring the bottom. The places where water was taken as samples are described as follows:

I (Center). A temporary pier, about 11 m. in length, was made of timber two days before in order to sample the water at the center of the pool. Two bottles of water at 30 cm. under the surface of the water were taken with Esmarch's apparatus. At the center the depth was one meter, the water temperature 9.6°.

II (Outlet). The breadth of the outlet was 2.5 m. and two fallen trees dammed it up. The depth of the water about here was 30 cm. and the water temperature was 9.4°. Sampling was carried out on the inside.

III (East border). Water was sampled one meter from the east border of the pool and 10 cm. under the surface of the water. Purple bacteria grew on the bottom here. The depth of water was 30 cm. and the temperature 10.2°.

IV (North-west border). Water was sampled 60 cm. from the north-west border of the pool and 10 cm. under the surface of the water. The depth was 45 cm. and the temperature 11.2°. Purple bacteria grew on the bottom here.

V (South border). Water was sampled 60 cm. from the south border of the pool and 10 cm. under the surface. The depth was 45 cm. and the temperature 11.0°. Several large trees had fallen here and were buried; if the trees were shaken many bubbles rose to the surface.

2. River Water.

This water was that of the artificial ditch which conducts water from the "A"-gathering pond to the salmon fry rearing-ponds. The water of "A"-gathering pond which is a natural one, consists of waste-water from the first and second reservoirs and spring water which gushes out nearly. Yamabe (smolts of masu) and frogs lived in the pond. The width, depth

and length of the conduct ditch are respectively 3 m., 25 cm. and about 200 m. Water plants grew on its bottom. The collection of the water sample was made at a place one meter upstream from the junction of the conduct ditch and the distributing one and at 10 cm. depth by means of Esmarch's apparatus.

3. Spring water which gushed out at the surface of the ground and flowed into the reservoir.

In the northern and north-western yard of the Nishibetsu Hatchery are many places where water gushes out of the ground. Water which gushed out near the reservoirs flowed into the reservoirs and might contaminate them. Sampling water could be secured with difficulty at such places. But fortunately spring water which gushed out in the bushes 7—8 m. distant from the second reservoir flowed into it near its north corner by a brooklet, 60 cm. in width and 15 cm. in depth. The 4th examination eggs had been received in this brooklet. The sampling was carried out 60 cm. distant from the cover (roof) of the reservoir and at 10 cm. depth.

4. The second Reservoir.

The water of the second reservoir had been investigated in April, when it was filled with water as usual during the business term, but at this time the sluice at the northeastern side of the reservoir was opened and water flowed out to the "A"-gathering pond. The level of the water fell about 30 cm. lower than during the business term and became about 60 cm. in depth. The water in the reservoir was collected at two places.

I (Water of the reservoir). Sampling was carried out 30 cm. outside the stockade which was erected in order to prevent the entering of floating substances into the conduit-pipe.

II (Spring water in the reservoir). There was a spring located at a place 4 m. southward from the north corner of the reservoir and 1.5 m. inside the border. Sampling was made at the center of the fountain by means of Esmarch's apparatus.

5. Spring Water.

There was a spring located 2 m. distant from the corner of the breeding pond of the masu (trout). Water gushed out vigorously from this spring, forming a little pool, 23 cm. in depth and 45 × 75 cm. in dimension, which supplied much water to the pond immediately without pollution. The water temperature was 9.5°.

All the above results are tabulated as follows:

Bacterial Content in one cc. of the various Waters, 1928.
(Nishibetsu Hatchery.)

Sample	Month of investigation	Total bacteria	Gelatin liquefiers
Source	April	1,100	37
1st Reservoir	April	49	1
2nd Reservoir	April	253	7
	May	145	13
Supply-trough	April	270	8
Water passed through diseased eggs . .	April	4,400	100
Water passed through sound eggs . . .	April	490	20
Inspecting Water	April	14	1

Sample	Month of investigation	Total bacteria	Gelatin liquefiers
The "Osoüsu" Pool:			
Center	May	283	21
Outlet	May	220	50
East Border.	May	750	74
North-west Border	May	564	44
South Border	May	765	116
River Water	May	50	10
Spring Water from the ground	May	60	0
Spring Water gushed out in the 2nd Reservoir	May	41	5
Unpolluted Spring Water	May	2.5	0

It will be seen from this table that the feeding water at the Nishibetsu Hatchery had more bacteria than the others excepting that in the "Osoüsu" Pool. Then it stood in need of a comparison with the feeding waters at other hatcheries. Therefore the bacterial numbers were investigated in the waters of the Pombetsu Hatchery owned by the Nemuro Fishery and Propagation Corporation and the Chitose Salmon Hatchery owned by the Hokkaido Government.

1. Feeding water of the Pombetsu Hatchery.

The reservoirs of the Pombetsu Hatchery which are arranged in a row, were so decayed and faulty that there was no comparison between them and the ones of the Nishibetsu Hatchery. The water was stored in a tank outside the hatching house after passing through ditches which were laid from the reservoirs to the tank, from which the water flowed into the house by a supply-trough. A sample was taken out of the tank. This sample was transported to the Nishibetsu Hatchery, where it was treated as the others had been five and a half hours after it was collected. This investigation was made about the end of May, 1928. The bacterial number in one cc. of the sample is calculated from the bacterial colonies which grew for 4 days.

Bacterial Content in the feeding Water of the Pombetsu Hatchery, May, 1928.

	Total bacteria	Gelatin liquefiers
Feeding water	42	8

2. Feeding water of the Nishibetsu Hatchery.

The bacterial content in the feeding water of the Pombetsu Hatchery was small as the above result shows, hence that of the Nishibetsu Hatchery was thrice investigated at about the end of December, 1928. Sampling was made in the supply-trough and at the places where the supply-pipes stood which gave water to the 5th and 33rd troughs. The water samples were treated as the other and the plates were incubated in the egg-trough at a temperature about 8^0 for 2 weeks.

3. Feeding water of the Chitose Salmon Hatchery.

The feeding water of the Chitose Salmon Hatchery was investigated the end of February, 1929. In this year many parent fish were caught and

the number of eggs taken far exceeded the capacity. The excess of eggs were placed in troughs which were temporarily and plainly arranged in the open air, that is, "Ruën", Rainbow trout rearing pond, and outdoors at the west of the first hatching house. Other water than ordinary was used as the feeding water in this case. All the waters investigated are briefly described as follows:

I (Feeding water of the 1st hatching house). The main conduit-pipe of the first hatching house being made of iron, samples could not be taken, but out-doors, a 4 m. wooden ditch connected the water tank and the iron conduit-pipe. Sampling was carried out in the wooden ditch, which also supplied the water to the temporary hatching apparatus out-side the first hatching house.

II (Feeding water of the 2nd hatching house). The sampling was carried out in the supply-trough and at the place where the supply-pipe which supplied the water to the 7th trough, stood.

III (Feeding water of the temporary apparatus in the rainbow trout rearing pond). The temporary apparatus was made by arranging eggtroughs in one of the rainbow trout rearing ponds where water had fallen. Sampling was made in the supply-trough and at the place where the supply-pipe which supplied the water to the 9th trough, stood.

The water samples were treated as the others had been, after being diluted decimally. The colonies which grew for 17 days were counted.

The results respecting feeding waters are tabulated as follows:

Bacterial Content in one cc. of the feeding Waters of Hatcheries, 1928—1929.

Names of hatcheries	Collecting place	Date of investigation	Bacterial content in one cc. of water		Duration of incubation
			Total bacteria	Gelatin liquefiers	
Nishibetsu Hatchery	2nd reservoir	April, 1928	253	7	4 days
	,,	May, 1928	145	13	5 days
	supply-trough	April, 1928	270	8	4 days
	,,	Dec., 1928	490	65	14 days
Pombetsu Hatchery . . .	tank	May, 1928	42	8	4 days
Chitose Hatchery	supply-trough of the first hatching house	Febr., 1929	55	0	17 days
	supply-trough of the 2nd hatching house	Febr., 1929	80	5	17 days
	supply-trough of the temporary apparat.	Febr., 1929	50	0	17 days

Bored Wells.

It was seen that the water of the Nishibetsu Hatchery contained more bacteria than the other two hatcheries where the disease had not occurred and that the water must have contained as few bacteria as possible. Such water would be the spring-water which gushed forth vigorously as seen in the above description, and it must be used as soon as gushed without being stored. Such water can be obtained from a bored well. In the summer of 1929 for trial two bored wells were made at a place 6—7 m. to the north from the hatching house at the Nishibetsu Hatchery, each being separated 4 m. from the other (8). Their waters were bacteriologically investigated the end of December, 1929.

The water from the well which delivered the larger quantity was used as the feeding water. This well attained 755 cm. depth below the ground

level and 788 cm. below the peak height of the water stream. The water of the other was used as the inspecting water. This well was bored to a depth of 718 cm. from the ground level and 752 cm. from the highest altitude attained by the water as it gushed forth. The water samples were collected with Esmarch's apparatus, from the well water used for feeding at two places 758 cm. and 52 cm. in depth from the top of the gushed out water and from the well water used for the inspecting water at two places 697 cm. and 191 cm. in depth from the top of the gushed out water. They were treated as the others had been without dilution. The gelatin plates were incubated in the egg-trough at a temperature of about 8° and the colonies which grew within 17 days were counted. The following result was obtained:

Bacterial Content in the Waters of the trial bored wells December, 1929. (Nishibetsu Hatchery.)

	Water from the bored well used as the feeding water		Water from the bored well used as the inspecting water	
Place where sampling was made (in depth)	758 cm.	52 cm.	97 cm.	191 cm.
Total bacteria	10	6	6	4
Gelatin liquefiers	0	0	0	0

It was known that the water that gushed forth from the bored wells which were 7—8 m. in depth had very few bacteria. The water of one bored well was drawn as the feeding water into the hatching house by means of the supply-trough, in which an oily film was floating on the water surface. The water of the well was theoretically enough in quantity for the eggs used for examination which were received in 18 troughs but there remained no excess quantity of water and it did not overflow at the end of the supply-trough. Therefore the surface water in the supply-trough was like stagnant water and did not change its location. For this reason bacteria floating on the water surface multiplied, forming a film, which was a swarm of rod bacteria. The water was investigated by sampling the water falling from the supply-pipe instead of the water in the supply-trough. (The trial hatching using the bored well water was conducted using the plant which consisted of 6 series of 3 common troughs with a capacity of 1.8 million eggs.) For the sake of comparison the ordinary feeding water was again investigated. Sampling was made in the supply-trough. Each of the samples was diluted to one-hundredth and treated as the others had been. The gelatin plates were incubated for 17 days in a trough at about 8°. The following result is obtained:

Bacterial content in the previously used and in the bored well feeding Water, December, 1929. (Nishibetsu Hatchery.)

Samples	Feeding water from the bored well	Previous and ordinary feeding water
Total bacteria	650	300
Gelatin liquefiers	50	50

The water of the bored well had contained at first very few bacteria, but upon flowing into the supply-trough the upper layer of water became

stagnant and some of the bacteria in it multiplied, forming a film on the surface. This film supplied many bacteria to the lower layer of water which flowed into the egg-troughs. Consequently the actual feeding water contained many bacteria and the result of the hatching became poorer and poorer as the hatching advanced. The following table proves these complications:

Result of the trial Hatching with the bored well Water, 1929. (Nishibetsu Hatchery.)
(Each trough received 100,000 eggs.)

Trough	Spawning Date	Date when eye-spot became visible	Hatching Date	Dead Eggs: before eye-spot was visible	Dead Eggs: after eye-spot was visible	Dead Eggs: total	Dead Eggs: %	Remarks
1	Oct. 5	Nov. 2	Nov. 30	1,540	3,365	4,905	4.9	
2	Oct. 5—30	,, 2—27	Nov. 30—Dec. 25	4,180	5,580	9,760	9.8	
3	Nov. 7—8	Dec. 5—6	Jan. 2—3	9,550	90,450	100,000	100.0	
4	,, 8	,, 6	,, 3	3,710	8,140	11,850	11.9	
5	,, 8	,, 6	,, 3	3,510	9,500	13.010	13.0	
6	,, 8	,, 6	,, 3	4,690	9,150	13,840	13.8	
7	,, 8	,, 6	,, 3	4,360	7,380	11,740	11.7	
8	,, 8	,, 6	,, 3	4,320	5,880	10,200	10.2	
9	,, 8	,, 6	,, 3	4,280	6,470	10,750	10.8	
10	,, 8	,, 6	,, 3	3,010	5.700	8,710	8.7	
11	,, 8	,, 6	,, 3	3,780	7,930	11,710	11.7	
12	,, 8—11	,, 6—9	,, 3—6	3,910	2,938	6,848	6.8	Sterilized by dipping in dil. K_2MnO_4 solution (troughs 12–18)
13	,, 11	,, 9	,, 6	1,360	1,619	2,979	3.0	
14	,, 11	,, 9	,, 6	1,420	2,223	3,643	3.6	
15	,, 11	,, 9	,, 6	2,520	2,572	5,093	5.1	
16	,, 11	,, 9	,, 6	2,030	2,416	4,446	4.4	
17	,, 11	,, 9	,, 6	2,180	2,534	4,714	4.7	
18	,, 11	,, 9	,, 6	2.150	1,804	3,954	4.0	

The number of dead ones among the eggs received at first was small, but if they were considered in detail, the number of dead eggs after the eye-spots became visible is greater than before the eye-spots were visible. This state was not normal. The reason for it is that the water contained a few bacteria at the beginning, and contained more and more bacteria afterwards. But if the eggs were dipped in the diluted solution of potassium permanganate (1 : 100,000) several times, damage was prevented.

It was thought that if the water had been greater in quantity and had been made to overflow at the end of the supply-trough, there would not have been so many dead eggs. Also it is known that the dipping of the eggs into the diluted solution of potassium permanganate several times prevents the disease.

Thereupon, in 1930 the plan that the bored well water should be used as the feeding water at the Nishibetsu Hatchery, was adopted. Four large bored wells were sunk (8), one at a place 4 m. distant from the trout breeding pond, a second at a place 10 m. north-west from the former, a third at the north corner of the hatching house and the other in the "B"-gathering pond. The water which was used as the feeding water, gushed out from the two former wells. (These will be called the first and second bored wells.)

These two wells were 788 cm. in depth. The water which gushed forth from the first was conveyed along the ground by means of a large iron pipe to the second well and confluxed with the water which gushed forth from

the latter. The confluxed water was conveyed on to the supply-trough in the hatching house. Sampling was carried on at each well by means of Esmarch's apparatus at the bottom and at places 545 cm. and 182 cm. in depth from the topmost point attained by the gushing water; and in the supply-trough sampling was made midway between the places where the two supply-pipes stood. These samples were treated as the others had been but without dilution. The gelatin plates were incubated in the trough where the water temperature was 9.5° for 14 days. This investigation was made late in March, 1931. The following result is obtained:

Bacterial Content in the bored well Water, March, 1931. (Nishibetsu Hatchery.)

	Total Bacteria				Gelatin liquefiers			
	Bottom	Middle Layer	Upper Layer	Supply-trough	Bottom	Middle Layer	Upper Layer	Supply-trough
Water of the 1st bored well	(15.5?[1])	2.5	3	5.5	0	0.5	0.5	0.5
Water of the 2nd bored well	0.5	2.5	1		0	0.5	0	

[1]) They were too large and it was suspected that the sample was polluted.

The newly sunk large bored well discharged water which contained as few bacteria as the previous trial ones.

The two other bored wells also were investigated. The bored well in the "B"-gathering pond was 742 cm. in depth and sampling was carried out at the bottom and at places 545 cm. and 182 cm. in depth from the topmost point to which the water gushed forth. The samples were treated as before. A wooden frame was constructed just above and around the spout of the bored well which was sunk at the corner of the hatching house. The depth of it could not be sounded and the sampling also could not be carried out in it. Therefore, the water was sampled by means of a sterilized 1 cc. pipette with great difficulty and immediately poured into the sterilized Petri dishes and pouring-plates were made. All plates were incubated for 14 days in the same trough as before. The following result was obtained:

Bacterial Content in the Water of the other bored well, March, 1931. (Nishibetsu Hatchery.)

	Total Bacteria			Gelatin Liquefiers		
	Bottom	Middle Layer	Upper Layer	Bottom	Middle Layer	Upper Layer
Water of the well bored in the Pond	0.5	1	1.5	0	0	0

	Total Colonies[1])
Water of the well bored at the corner of the hatching house . .	8 or 91

[1]) Its samples were collected with great difficulty by means of faulty method which was different from the others and consequently such a result was obtained. It was suspected that the samples were polluted.

It was known according to the previous investigations as well as this one that the water discharged by the bored wells sunk 7—8 m. in depth at any place in the yard of the Nishibetsu Hatchery had very few bacteria.

In the business term of 1930 the water of the 1st and 2nd bored wells containing few bacteria was used as the feeding water from the 7th January, 1931, the previous feeding water being discontinued. But the result of the hatching was bad and the percentage of dead ones among the eggs (about 11.3 millions) which were incubated in the bored-well water only was 30.0%, while the percentage of dead ones among the eggs (2.5 millions) incubated in the previous feeding water only was 16.5%. It was obscure what had caused such a bad result of the hatching in the bored well water. In this year the water molds grew very luxuriantly in the troughs and the damage in this year was different from that of the previous years. But there were a few eggs which were incubated in the water from the other four bored wells. One of them was the bored well at the corner of the hatching house in whose water 300,000 eggs were incubated. Secondly water from the well bored in the pond was used and 100,000 eggs were incubated in its water. Using water mixed together from the other two small bored wells which were sunk in 1929, 100,000 eggs were incubated. The results of the hatching in the waters of the bored wells were as follows:

Results of the examination of the Hatching in the Water of the bored wells, 1931. (Nishibetsu Hatchery.) (Each trough received 100,000 eggs.)

Kind of the feeding waters	No. of trough	Spawning Date	Date when eye-spot was visible	Hatching Date	Dead Eggs: before eye-spot w. visible	Dead Eggs: after eye-spot w. visible	Dead Eggs: Total	Dead Eggs: %
Water of the bored well at the corner of the hatching house	1	Jan. 4	Febr. 1	March 1	6,200	2,600	8,800	8.8
	2	,, 4	,, 1	,, 1	4,800	2,900	7,700	7.7
	3	,, 4	,, 1	,, 1	4,900	2,500	7,400	7.4
Sum	. . .	. . .	. . . . . .	. . .	15,900	8,000	23,900	8.0
Water of the bored well sunk in 1929	1	,, 1	,, 1	,, 1	5,900	900	6,800	6.8
Water of the bored well in the pond	1	Febr. 10	March 14	Apr. 16	6,000	3,500	9,500	9.5

The number of the eggs was only 500,000 and the percentage of dead eggs fluctuated from 7.4 to 9.5 and the results were not very good, but there was one fact that should not be overlooked. This fact was that the number of dead eggs in any trough before the eye-spot became visible was more than after it became visible. Up to that time it was a characteristic in any damaged trough that the dead eggs were more in number after the eye-spot became visible than before it was visible. That the dead eggs were very numerous before the eye-spot became visible, may be attributed perhaps to the fact that the apparatus was placed in the open-air and consequently the treatment was defective. Notwithstanding this, the examination proved that the water containing few bacteria is very suitable for feeding water, and the "Progress of Work in 1931" of the Nishibetsu Hatchery also proves it. In the business term of 1931 almost all the eggs received were dipped into the dilute solution of potassium permanganate or formaldehyde but

some eggs were not dipped and were treated in the ordinary manner. The hatching result of the latter eggs shows that the ratio of the dead eggs was large at the beginning of the term but became smaller and smaller as the term advanced. It was also found that in the beginning of the term the number of dead eggs was larger after the eye-spot became visible than before it became visible but became smaller and smaller as the term advanced and at last became smaller than before it had become visible. The disease which had been raging for several previous years was prevented by means of the use of the bored well water containing few bacteria. (At the Nishibetsu in 1931, one more bored well was newly sunk in addition to those above-called the 1st and 2nd bored wells, and the one at the corner of the hatching house. The water of these 4 bored wells has been used as the feeding water.)

It was concluded from the above experiments and descriptions that the water which contained as few bacteria as possible should be used as the feeding water.

Bacteria isolated from the damaged Eggs.

At first it was thought that the damage to the eggs at the Nishibetsu Hatchery was caused by something like a hemispherical gelatinous mass which was located on the egg-membrane. This mass, one millimeter in diameter, was apparently white in water and a transparent jelly-like mass out of water. It was a colony of round-ended bacteria. At first it was believed that the region of the egg-membrane where the mass was situated, was concavely eroded. According to the investigation at the Nishibetsu and Pombetsu hatcheries the white jelly-like mass must have accidentally clung to the eggs and was not the cause of the disease. The mass perhaps was a dirt — like milt or humour — which bacteria grew on. It was concluded that the white mass had no relation to the disease.

The eggs which were attacked by this disease, lost their characteristic turgidity and their egg-membranes were seen to be hemispherically scooped out if they were microscoped from the superficies. Semicircular scoopings were seen on the slices of the damaged egg-membranes if a cross section of the slices was microscoped. Hanzawa and others (6, 7) reported that many bacteria were found at the concave spots on the damaged egg-membranes. Many bacteria were isolated from these damaged eggs at the Nishibetsu Hatchery at 3 different times, that is, in April, May and December of 1928. As soon as the damaged egg was picked out of an egg-tray, it was laid on a common agar or glycerin-agar plate and rolled around all over the plate as much as possible and taken away. The agar plates were incubated in an egg-trough at about 8—9° or at room temperature, but strange to say only a very few bacterial colonies grew. An example will be described. Some damaged eggs were picked out of the egg-tray which were photographed on the 24th December, 1928 and were treated as in the above description on the glycerin-agar plates. After 4 days' incubation the numbers of grown bacterial colonies were as follows:

No. of Petri dishes	I.	II.	III.	IV.	V.	Average
Colonies	25	55	19	31	15	29

As the impression preparations from the damaged eggs showed many bacteria, it was thought that the surface growth on the above plates must have occurred along the route over which the damaged eggs were rolled,

but actually it was not so as only a few colonies grew. Were there some other bacteria which could not grow in these media?

At any rate there were isolated 35 kinds of bacteria from the damaged eggs using common agar and glycerin-agar media 3 times in 1928, that is, 21 kinds at the first time in April, 5 kinds at the second time in May, and 9 kinds at the third time in December. The nine kinds of bacteria isolated at the third time were studied in detail and the remaining bacteria were only studied as to their cultural characters. Nineteen kinds among them were identified but the other 7 bacteria were not. The studied bacteria were as follows.

1. Flavobacterium turcosum (Zimmermann) Bergey et al.

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 4th ed. 1934. p. 156; Bacillus turcosa Zimmermann, Die Bakterien der Nutz- und Trinkwässer, insbesondere des Wassers der Chemnitzer Wasserleitung. II. Reihe. 1894. S. 32; Pseudomonas turcosa (Zimmermann) Migula, System der Bakterien. Bd. 2. 1900. S. 937; Bacterium turcosum (Zimm.) Lehm. et Neum., Bakteriologische Diagnostik. Bd. 2. Aufl. 7. 1927. S. 466.

This bacterium does not kill the salmon eggs. It is represented by the symbol "g—1" in this paper.

2. Pseudomonas fluorescens Migula.

Bergey's Manual, 4th ed. 1934. p. 180; Bacillus fluorescens liquefaciens Flugge, Die Mikroorganismen. II. Teil, 3. Aufl. 1896. S. 292; Pseudomonas fluorescens (Flügge) Migula, System der Bakterien. Bd. II. 1900. S. 886; Bacterium fluorescens (Flügge) Lehm. et Neum., Bakteriologische Diagnostik. Bd. 2. 7. Aufl. 1927. S. 472.

Two different strains which belong to the group of Ps. fluorescens are among the isolated bacteria. They are represented by the symbols "R—2" and "g—2". The one does not produce hydrogen sulphide and indol but the other rarely produces them. The milk in which the "R—2" is inoculated becomes alkaline after the peptonization, but the milk in which the "g—2" is inoculated is always neutral after the peptonization. Litmus is reduced by the "g—2" but not reduced by the "R—2". Both of them kill the salmon eggs.

3. Pseudomonas hydrosulfurea (Zörkendörfer) Migula.

Migula's System der Bakterien. Bd. 2. 1900. S. 898; Bacillus oogenes hydrosulfureus β Zörkendörfer, Arch. f. Hyg. Bd. 16. 1893. S. 395; Bacillus oogenes hydrosulfureus (Zörkendörfer) Matzuschita, Bakteriologische Diagnostik. 1902. S. 136.

This bacterium kills the salmon eggs. It is represented by the symbol "R—3" in this paper.

4. Pseudomonas ovicola (Zörkendörfer) Migula.

Migula's System der Bakterien. Bd. 2. 1900. S. 925; Bacillus oogenes fluorescens γ Zörkendörfer, Arch. f. Hyg. Bd. 16. 1893. S. 395; Bacillus fluorescens fuscus (Zörkendörfer) Matzuschita, Bakteriologische Diagnostik. 1902. S. 350.

This bacterium does not kill the salmon eggs. It is represented by the symbol "R—1" in this paper.

5. Pseudomonas piscova Hanzawa et Takeda.

Journ. of the Cymology (Jozogaku Zasshi, Osaka, Japan). Vol. 9. 1931. p. 571.

1. Morphology: Bacilli, 0.6—1.3 by 0.55 μ, with rounded ends. Motile, possessing a polar flagellum. It forms no endospore. It readily stains with all the common stains, but is gram-negative.

2. Relation to air: Facultative anaërobic.

3. Relation to temperature: Abundant growth between 22° and 32°. At 15° its growth is poorer. At 37° and 40° a scanty growth. The optimum growth temperature is between 22° and 27°. The following cultural characters were noted at 27°, except for the gelatin culture.

Cultural Characters:

Gelatin colonies. White colonies, one millimeter in diameter. Medium round the colonies liquefied with a saucer-shaped depression and homogenously turbid. Microscopically: at the surface, the colonies with radially striped internal structure have a curly margin. Colonies are similar to Ps. hydrosulfurea. In depth, the colonies have a grumose center, which is surrounded by a radially striped structure Agar colonies (the surface growth). White, nearly transparent colonies. Microscopically: Yellowish green colonies with finely dotted or homogenous center, and homogenous, brilliant and transparent margin.

Gelatin stab. At the mouth of puncture hemispherical pocket-shaped depression, and the medium round the depression spherically liquefied. Under it the medium slenderly liquefied along the line of puncture. At first the whole shape of the liquefied portion is napiform with an air bubble at the top and the liquefied portion is homogenously turbid and in the lower, slenderly liquefied portion the white thread-like bacterial mass is in a coil. Afterwards saccate liquefaction occurs, the liquefied upper part turbid, the middle part becomes gradually clearer lower down; in the lowest part a white thread-like bacterial mass precipitates in a coil. Agar slant. Very slightly grayish yellow, smooth, lustrous, terrated surface growth which is more or less transparent near the condensed water, which is turbid, with a fine powdery sediment, and the substrate is tinted fluorescent green. Potato. The surface growth is at first light yellowish, then brown and at last (after 2 weeks or more) very dark brown. Potato becomes pinkish.

Bouillon. Fluid turbid, green fluorescent, with a white, thin pellicle and white sediment, which is very slimy. When cultured in bouillon for 2 weeks or more, it produces a little H_2S. Indol not formed. An odor like trimethylamine emitted. Milk. Peptonified. Litmus milk. Milk immediately peptonified, colored fluorescent green and consequently the peptonified fluid becomes dark purple. The reaction neutral. Nitrate solution (made after Frost's Laboratory Guide in Elementary Bacteriology. 1925. p. 64). Turbid, with a thin pellicle and white sediment. All KNO_3 (contained at the rate of 0.02%) reduced within 4 days. The progress of the reduction was as follows: On the second day one or two bubbles were seen at the surface of the fluid, on the third day the whole surface of the fluid was covered with bubbles, on the fourth day one or two bubbles only were seen at the surface of the fluid, and on the fifth day no bubbles were found and the presence of KNO_3 could not be proved by means of the diphenylamine solution in concentrated H_2SO_4. This organism has a denitrifying power.

Chemical characters:

a) Pigment. A fluorescent green pigment produced. b) Odor. An odor like trimethylamine emitted from bouillon and nitrate solution cultures. c) Production of gas and indol. None. d) Production of H_2S. A little H_2S produced after a long period culture. e) Reduction of nitrate. Denitrification. f) Virulency. Salmon eggs killed.

This bacterium is represented by the symbol "g—3" in this paper.

6. Pseudomonas putrida (Flügge) Migula.

Migula's System der Bakterien. Bd. 2. 1900. S. 912.

Syn. Bacillus fluorescens putridus (Flügge) Flügge, Die Mikroorganismen. II. Teil, 3. Aufl. 1896. S. 292.

Bacillus fluorescens putidus Flügge, Eisenbergs Bakteriologische Diagnostik. 1891. S. 146; Migulas System der Bakterien. Bd. 2. 1900. S. 912; Lehmann und Neumanns Bakteriologie und Bakteriologische Diagnostik. Teil II, 1. Aufl. 1896. S. 293; Lehmann-Neumanns Bakteriologische Diagnostik. Bd. 2. 7. Aufl. 1927. S. 475.

Bacillus fluorescens putridus Flügge, Matzuschitas Bakteriologische Diagnostik. 1902. S. 352, und die Lehre von den parasitären Krankheiten. Bd. 2. 2. Aufl. 1911. S. 447; Macé's Traité pratique de Bactériologie. T. 2. 1913. p. 426.

Pseudomonas putida (Flügge) Migula, Engler und Prantls, Die natürlichen Pflanzenfamilien. Teil I, Abt. I a. 1900. S. 29; Chester's Manual of determinative Bacteriology. 1913. p. 326.

Pseudomonas putida Migula, Bergey's Manual, 4th ed. 1934. p. 183. Bacterium putidum (Flügge) Lehm. et Neum., Bakteriologie und Bakteriologische Diagnostik. Teil II. 1. Aufl. 1896. S. 273; Lehmann-Neumanns Bakteriologische Diagnostik. Bd. 2. 7. Aufl. 1927. S. 475.

This bacterium kills the salmon eggs. It is represented by the symbol "g—4" in this paper.

7. Achromobacter nijibetsui nov. sp.

1. Morphology: Bacilli, 0.65—0.9 μ wide and 1.0—1.9 μ long, with rounded ends. It forms no endospore. It is motile. Flagella 1—3 in number at one end, but rarely at both ends. It stains readily with all common stains, but is negative to Gram stain.

2. Relation to the air: On gelatin and glucose-agar stab-cultures the growth becomes gradually scanty from the surface downward. On the shake culture in the glucose-agar medium the growth is seen at the surface and in the upper layer 3 mm. in depth but not in the deeper regions. Therefore, this bacterium is aërobic.

3. Relation to temperature: It grows luxuriantly between 15° and 32° but the growth at 37° is a little poorer. Its optimum growth temperature is 22°. The following cultural characters were noted at 22°.

Cultural characters:

Gelatin colonies. No liquefaction. Surface and deep: white rounded colonies, the maximum ones 1.6—1.3 mm. in diameter of 8 day culture. Microscopically: on the surface; light yellowish brown, slightly and finely, dotted circular colonies, with dark, concentric compact inner parts. In depth; light yellowish brown, slightly curly colonies with homogenous margin. Agar colonies (surface growth). Circular colonies with a white or dirty light yellow colored center and transparent margin. Microscopically: light olive, homogenous at the center, with a short-haired structure radiating from the center, the margin rounded or lobated and homogenous, very brilliant.

Gelatin stab. No liquefaction. Light yellowish surface growth with poor, white, smooth, thread-like growth along the line of puncture, which is poorer lower down. Agar slant. Light yellowish, smooth, slimy, well elevated surface growth with lustre. Condensed water turbid, with light yellowish powdery precipitate. Potato. Light pinkish slimy growth, afterwards dirty yellowish. Potato becomes grayish.

Bouillon. Very turbid, with a little white sediment. A little H_2S is sometimes produced if it is cultured for a long period (over 2 weeks). Indol not produced. Milk. No change. Litmus milk. Litmus not reduced. As the fluid gradually becomes bluish, it slowly becomes alkaline, but milk remains apparently unchanged, except that a white pellicle forms. Nitrate solution. Turbid, with white sediment. Nitrate reduced to nitrite.

Chemical properties:

a) Pigment, odor, gas and indol. None. b) Formation of H_2S. H_2S formed slightly in the culture after a long period. c) Liquefaction of gelatin. Not liquefied. d) Reduction. Nitrate reduced to nitrite. e) Virulency. Does not kill the salmon eggs.

There are no bacteria which are analogous to this bacterium. It is recognized as a new species, which is named Achromobacter nijibetsui.

This bacterium is represented by the symbol "I" in this paper.

8. Achromobacter punctatum (Zimmermann) Bergey et al.

Bergey's Manual, 4th ed. 1934. p. 231; Bacillus punctatus Zimmermann, Die Bakterien unserer Trink- und Nutzwässer, Chemnitz. I. Reihe. 1890. S. 38; Bacterium punctatum (Zimm.) Lehm. et Neum., Bakteriologische Diagnostik. Bd. 2. 7. Aufl. 1927. S. 477.

This bacterium kills the salmon eggs. It is represented by the symbol "II" in this paper.

Key for Differentiation of the isolated Bacteria.

Organisms rod-shaped. Endospores not formed. Motile by means of polar flagella. Gram-negative.

A. Gelatin not liquefied.			
a) A fluorescent green pigment not produced . .	"I"	(Achromob. nijibetsui)	Salmon eggs not killed
b) A fluorescent green pigment produced	"R—1"	(Ps. ovicola)	Salmon eggs not killed
	"g—4"	(Ps. putrida)	Salmon eggs killed
B. Gelatin liquefied.			
a) A fluorescent green pigment not produced.			
α) No gas produced . .	"g—1"	(Flavob. turcosum)	Salmon eggs not killed
β) Gas produced . . .	"II"	(Achromob. punctatum)	Salmon eggs killed
b) A fluorescent green pigment produced.			
α) H_2S not produced.			
1. Indol not produced	"R—2"	(Ps. fluorescens)	Salmon eggs killed
	"g—3"	(Ps. piscova)	Salmon eggs killed
2. Indol produced .	"g—2"	(Ps. fluorescens)	Salmon eggs killed
β) H_2S produced . . .	"R—3"	(Ps. hydrosulfurea)	Salmon eggs killed

The Relation between the isolated Bacteria and the Death of Salmon Eggs.

Bacterial infusions were made with the agar slant cultures of the isolated bacteria and sound salmon eggs were put into the infusions in order to infect the salmon eggs with the bacteria. But the eggs immediately died and the damage which occurred in the egg-troughs was not imitated. The relation between the isolated bacteria and the death of the salmon eggs only was studied.

The isolated bacteria were cultured on the common agar slants for 4 days in the egg-trough at $8—9^0$. Fifty cc. of the feeding water was poured into each culture and each bacterial infusion thus obtained poured into a 300 cc. beaker. Thirty sound salmon eggs whose eye-spots had colored were put into each beaker, which was placed in the egg-trough and after a week the salmon eggs were examined. This investigation was made early in January, 1929, at the Nishibetsu Hatchery. The following result was obtained:

Symbol of bacteria	Result of examination
"I"	All the 30 eggs were yet sound after 1 week.
"II"	On the third day the embryos in all the eggs had already died and became white.
"R—1"	All the 30 eggs were yet sound after 1 week.
"R—2"	On the third day all the eggs died.
"R—3"	On the third day all the eggs died.
"g—1"	All the 30 eggs were yet sound after 1 week.
"g—2"	On the third day all the eggs died.
"g—3"	On the third day all the eggs died.
"g—4"	On the third day all the eggs died.
Control	Instead of a bacterial infusion the feeding water was used. All the 30 eggs were yet sound after one week.

Six bacteria among 9 isolated ones killed the salmon eggs in 2 days. If the relation between the gelatin liquefying character of the bacteria and the death of the salmon eggs is investigated the following result is obtained:

The bacteria which liquefy gelatin and kill the salmon eggs, are "II", "R—1", "R—2", "g—2" and "g—3";

The bacterium which liquefies gelatin and does not kill the salmon eggs, is "g—1";

The bacterium which does not liquefy gelatin and kills the salmon eggs, is "g—4";

The bacteria which do not liquefy gelatin and do not kill the salmon eggs, are "I" and "R—1".

Five bacteria among 6 gelatin liquefiers kill the salmon eggs. Thus the character of the gelatin liquefaction may have some relation to the death of salmon eggs.

In late December of that year (1929) the same experiment was carried out again with the same bacteria.

At first each of the isolated bacteria inoculated on the common agar slants on the 7th December, was incubated for one week at the optimum growth temperature. All the cultures were transported to the Nishibetsu Hatchery from Sapporo. On the 26th December 100 cc. of the feeding water was poured into each culture and each of the bacterial infusions thus obtained was poured into a 300 cc. beaker. Forty sound eggs taken on the 17th November, and treated by using the ordinary feeding water were picked out. Forty other sound eggs taken on the 11th November and treated by using the bored well water were picked out. The two lots were put into separate beakers, which were placed in an egg-trough. During the examination period the beakers were slightly shaken once a day in order to mix air into the infusions. As all the eggs died in some of the beakers on the fifth day, the experiment was discontinued and the dead eggs in every beaker were counted.

Symbol of bacteria	"I"	"II"	"R—1"	"R—2"	"R—3"	"g—1"	"g—2"	"g—3"	"g—4"	control	average
Number of dead eggs .	41	77	43	78	80	40	52	80	75	35	60.1
Percentage of dead eggs .	51.25	96.25	53.75	97.50	100.00	50.00	65.00	100.00	93.75	43.75	75.13

The bacteria which show a percentage of dead eggs above the average one of 75.13 % are recognized to be those which kill the salmon eggs; and this and the last results are to be considered as follows:

Symbol of bacteria	"I"	"II"	"R-1"	"R-2"	"R-3"	"g-1"	"g-2"	"g-3"	"g-4"
The last time . .	—	+	—	+	+	—	+	+	+
This time . . .	—	+	—	+	+	—	—	+	+

N. B.: + denotes that salmon eggs were killed, and — denotes that they were not killed.

The results coincide for all the bacteria excepting "g—2". But the percentage of dead eggs of "g—2" is larger than each of the 3 bacteria which did not kill eggs and corresponds to 1.3 times the latter and to 1.5 times that of the control. This perhaps proves that the virulency becomes weak when repeated cultures are made in artificial media.

If the bacteria are put in order of turbidity of the bacterial infusions from clear to turbid, it is as follows:

Symbol of bacteria	Control	"g-1"	"R-1"	"I"	"g-2"	"g-4"	"g-3"	"R-2"	"R-3"	"II"
Percentage of dead eggs .	43.75	50.00	53.75	51.25	65.00	93.75	100.00	97.50	100.00	96.25
Clear or turbid	clear		a little turbid			turbid			very turbid	
Order of the above . . .	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

Ten cc. of the feeding water were poured into each test-tube of the agar-slants from which the bacterial infusions were made. Five eggs were put into each test-tube and the test-tubes were placed in the egg-trough for 8 days. Then the content of each test-tube was emptied into a 300 cc. beaker with 90 cc. of the feeding water. The turbidity of the bacterial infusion in each beaker was examined. The result was as follows:

Symbol of bacteria	Control[1])	"g-1"	"R-1"	"g-2"	"g-4"	"I"	"R-2"	"II"	"g-3"	"R-3"
Percentage of dead eggs .	43.75	50.00	53.75	65.00	93.75	51.25	97.50	96.25	100.00	100.00
Clear or turbid	Clear				a little turbid			very turbid		
Order of the above . . .	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

[1]) The test-tube of an agar slant in which no bacterium was inoculated was treated like the inoculated test-tubes.

The two orders of turbidity of the infusion of each bacterium were averaged from the two preceding tables and according to the result thus obtained all the bacteria may be arranged as follows:

Symbol of bacteria	Control	"g-1"	"R-1"	"g-2"	"I"	"g-4"	"R-2"	"g-3"	"II"	"R-3"
Averaged order of turbidity .	1	2	3	4.5	5	5.5	7.5	8	9	9.5
Percentage of dead eggs. .	43.75	50.00	53.75	65.00	51.25	93.75	97.50	100.00	96.25	100.00

It is known from the above results that the bacteria which made the water turbid, also killed the salmon eggs.

Bacterial Content in the Feeding Water passed through Troughs.

The feeding water at the Nishibetsu Hatchery contained many more bacteria than that used at the other hatcheries as the above descriptions show. It has also been described, that among the bacteria isolated from the damaged eggs the gelatin-liquefiers which made the water turbid, also killed the salmon eggs. It is thought from these facts that the damage was caused by certain bacteria at the Nishibetsu Hatchery. But the deterioration of the egg-membranes could not be shown to be caused by the infection of the bacteria upon the eggs which was to be regretted.

If the damage was caused by bacteria, the bacterial contents of the waters which passed through either damaged or sound eggs should be different. An investigation in this connection was held.

First, in the middle of April 1928, at the Nishibetsu Hatchery the water in the supply-trough and the water which passed through the damaged or the sound eggs were investigated. As their bacterial contents have been described under "Bacterial content of the feeding water", the results only will be cited here.

Samples	Water in the supply-trough	Water which passed through damaged eggs	Water which passed through sound eggs
Tothl bacteria . . .	270	4,400	490
Gelatin-liquefiers. . .	8	100	20

The increase of bacteria in the water which passed through the damaged eggs was larger than of that which passed through the sound eggs. Of course this may be inconclusive, for there were more damaged eggs than sound ones; but it can be seen that there was such a tendency. Therefore, the number of bacteria in the water which passed through the troughs in which damaged or sound eggs were received, was carefully examined and thinking that it might be of some help to the bacteriological investigation of the damaged eggs, the investigation was pushed through.

The next investigation was held in late December, 1928. The 5th, 6th, 7th and 8th troughs were selected as the ones in which the damaged eggs were to be received. These eggs were taken on the 3rd November. About the 22nd or 23rd December they suddenly became very soft and their egg-membranes became very much deteriorated. The 33rd, 34th, 35th and 36th troughs were selected as the ones receiving sound eggs. The eggs in them were taken on the 20th November, 4th and 19th December. The soundness of these eggs was judged by a microscopic examination.

Sampling in the supply-trough was made at the places where the supply-pipes bringing water to the 5th and 33rd egg-troughs stood. Sampling in each egg-trough was made from the middle layer of water between the 4th stack and the wooden-dam. The gelatin plate cultures were made by using one cc. of each sample diluted decimally. The plates were incubated in the egg-trough at about 8° for 2 weeks. The following result was obtained:

Bacterial Content of Waters which passed through the damaged and sound Eggs, December, 1928. (Nishibetsu Hatchery.)

Kind of Samples	Places sampled	Total Bacteria	Gelatin liquefiers
Water of the supply-trough	Supply-pipe for the 5th trough	520	80
Water of trough receiving the damaged eggs . . .	5th trough	1,350	125
	6th trough	5,370	1,005
	7th trough	5,610	885
	8th trough	7,495	3,035
Water of the supply-trough	Supply-pipe for the 33rd trough	460	50
Water of troughs receiving the sound eggs	33rd trough	405	20
	34th trough	630	45
	35th trough	575	70
	36th trough	665	105

It was proved that the bacteria of the water were more remarkably increased in passing through the damaged eggs than in passing through the sound eggs.

Moreover, in order to compare this result the bacterial contents of the water in the egg-troughs at the Chitose Hatchery, the model hatchery in Hokkaido, were investigated in late February, 1929. Here the following 5 samples of water were desired as those to be selected as materials for the investigation.

(1) Water of the egg-troughs receiving the eggs from which fry would hatch in the nearest future: For this purpose a series of the 53rd, 54th, 55th and 56th troughs in the first hatching house was selected. The water flowed into the 53rd trough from a supply-pipe and down into the 53rd, 54th, 55th and 56th troughs in turn. The eggs received in the troughs were taken on the 24th December 1928, and fry were expected to hatch out on the 23rd February, 1929. The collection of samples was made on the 21st February.

(2) Water of the troughs receiving the eggs whose eyes had most recently become completely colored: For this purpose a series of the 7th and 8th egg-troughs in the second hatching house was selected. They were different in length from all the above egg-troughs being 2 ken (4 m.) in length. Each of them was divided by a floating wooden-dam into two equal parts at the middle while all the above egg-troughs 1 ken (2 m.) in length. A 2-ken trough can receive 200,000 eggs divided into 8 stacks while a 1-ken trough can reveive 100,000 eggs divided into 4 stacks. The water flowed into the 7th trough from a supply-pipe and down through the 7th and 8th troughs in turn. The eggs received in the troughs were taken on the 21st January, 1929 and their eyes became completely colored on the 19th February. The collection of samples was made on the 22nd February.

(3) Water of the troughs receiving the eggs which had been most recently taken: For this purpose the 2-ken troughs arranged in one of the rainbow trout rearing ponds where the water had gone down, were selected. The series of the 9th and 10th troughs received the eggs most recently taken. All the eggs were taken on the 6th, 8th and 10th February; and the ones taken on the 10th February were the last eggs taken in that business year (1928). The collection of samples was made on the 21st February.

(4) Water of the troughs receiving the damaged eggs: The eggs received in the 10th trough in the 2nd hatching house were damaged. The damage of the eggs was in the same state as at the Nishibetsu Hatchery and the egg-membranes were very much deteriorated. A series of the 9th and 10th 2-ken troughs were selected for this purpose. The eggs were taken on the 28th and 29th December, 1928. The collection of samples was made on the 21st February, 1929.

(5) Feeding Waters: The feeding waters at the Chitose Hatchery have already been described under "Bacterial content of the feeding waters".

Sampling water in each 1-ken trough was made from the middle layer of water between the 4th stack and the wooden-dam, and in each 2-ken trough from the middle layer of water between the 4th stack and the floating wooden-dam and also from between the 8th stack and the wooden-dam. The gelatin plate cultures were made by using one cc. of each sample diluted to one-tenth. The plates were incubated in the egg-trough at about 8^0 for 17 days. The following result was obtained.

Bacterial Content of Waters which passed through the Groups of Eggs under various Conditions, February, 1929. (Chitose Hatcher.)

Kind of Samples		Places sampled		Total Bacteria	Gelatin-liquefiers
Water of the troughs receiving the eggs from which fry would hatch in the nearest future (at the 1st hatching house)		Supply-trough		55	0
		53rd trough		40	0
		54th trough		245[1])	45
		55th trough		70	0
		56th trough		60	0
At the 2nd hatching house		Supply-trough		80	5
	Water of the troughs receiving the eggs whose eyes had most recently become thoroughly colored	7th trough	upper part	1,490[2])	160
			lower part	105	10
		8th trough	upper part	above 5,000[3])	many
			lower part	320	15
	Water of the troughs (the 10th one receiving the damaged eggs)	9th trough	upper part	520	10
			lower part	180	50
		10th trough (damaged eggs)	upper part	1,040	80
			lower part	413	30
Water of the troughs receiving the eggs which had been most recently taken (the temporary apparatus arranged of troughs in the pond where water had gone down		Supply-trough		50	0
		9th trough	upper part	above 6,000	many
			lower part	1,325	30
		10th trough	upper part	1,125	150
			lower part	835	20

[1]) This number was too large, the sample probably was polluted.
[2]) In addition to this many molds were found.
[3]) In addition to this many molds were found.

Most of the troughs used at the Chitose Hatchery are 2 ken in length while all the troughs at the Nishibetsu Hatchery are 1 ken in length. Thus it may be not strictly accurate that the results obtained at both hatcheries are compared, but the following facts can be recognized.

(1) If the eggs are sound although the hatching is near, the bacterial content of the water increases, but not to exceed 50 per cent, on passing through them.

(2) In the water that passed through the 4 troughs receiving the damaged eggs at the Nishibetsu Hatchery, the bacterial content increased about 15 times. But the damaged eggs at the Chitose Hatchery were received in a 2-ken trough and the result obtained at the latter hatchery should not be compared with the one at the former hatchery.

(3) The water of the upper part of the 2-ken troughs had many more bacteria than the water of the lower part. This might have been caused in consequence of the following conditions: The floating wooden-dam at the middle of the 2-ken trough makes the upper layer of water in the upper part of the trough stagnant and the bacteria which are contained in the upper layer of water multiply to form a bacterial film on the water surface. The water in the lower part overflows over the wooden-dam and consequently no bacterial film is formed. The bacteria of the film contaminated the sampling apparatus with the possible result that the samples may be contained bacteria from the film in addition to those actually contained which

were slightly less than in the lower part of the trough. But this bacterial film was occasionally destroyed by various treatments during the hatching period and the eggs received in such troughs were not much damaged. This reasoning is proved by the fact that the hatching results in the upper part is nearly equal to that in the lower part.

At any rate, the following conclusions may be drived from the above experiments.

(1) When the water passes through the sound eggs, there is a tendency for its bacterial content to increase, but that increase does not more than double the content.

(2) When the water passes through the damaged eggs, its bacterial content increases very much extending to over 15 times.

The damaged Eggs and their absolute Firmness to Pressure.

The damage to the salmon eggs at the Nishibetsu Hatchery was caused by bacteria as the above descriptions show and not by the deficiency in the nutrition as stated by S e k i n e (9, 10).

Now, the course of the disease will be considered.

From the Shuwan Spawning House impregnated salmon eggs were transferred about 8 km. to the hatching house at the Nishibetsu Hatchery. But during the embryo development some eggs were attacked by disease. It was in the earliest of all the stages of embryo development that the damage was found on the eggs about 3 weeks after the spawning. The exact time when the eggs were seized with the disease could not be told. The damage happened either at an early stage of the embryo development or at a later stage when a fairly long time had elapsed after the eyes became thoroughly colored. In the early stages of the damage the deterioration of the egg-membrane was invisible to the naked eye, but if a cross section was examined microscopically small semicircular concavities were seen at the outer sides of the membranes. The death of the eggs sometimes happened in succession in the trays following that time. As the symptoms advanced the turgidity of the eggs became less and less and if the damaged eggs were pressed they were easily crushed; and concavities also became larger and larger and the membrane was deteriorated to over one third of its thickness. (The salmon egg-membrane is about 78 μ in thickness and consists of two layers, the outer of which is a homogenous egg-shale about 0.3 μ in thickness. The inner one is a very thick membrane with a radial structure — zona radiata.) When the damaged eggs came to this state, it was seen that their egg-membranes were hemispherically scrooped out, on microscoping from the superficies. On the more heavily damaged ones hemispherical scroops were massed in groups here and there.

As the stage of the disease advanced, many red oil drops floated on the water surface and much white egg-yolk stuck on the bottom of the egg-troughs. This showed that the egg-membranes had burst. At that time also water molds grew luxuriantly. The egg-yolk and oil drops of the damaged eggs were seen here and there more brightly than in the normal eggs through the egg-membranes, showing that the egg-membranes were deteriorated. If the membranes of the damaged eggs were stripped off and examined, they were seen to be thin, transparent, and to have small openings here and there, with a net-like appearance. Then many dead eggs were found in the egg-trays, and living ones having tails, heads, or tails and heads pro-

truding from the deteriorated egg-membranes. Embryo fish having heads put forth did not seem to escape death while most of the embryo fish having tails put forth escaped death and hatched out. Fry with abnormal circular embryo-sacs were also seen in such trays. In the trays were some eggs whose membranes had not yet burst but seemed apparently like those of sound eggs in the water, but if they were lifted out of the water in the trays they seemed out of shape like deflated India-rubber balls from lacking turgidity. Their wretched state was as if the eggs were pressed by heavy weight. An offensive odor was also emitted from the egg-troughs. If the eggs at very late stage of the embryo development were in such a state, the hatching was seen in the trays but the hatch did not progress simultaneously; instead, it lasted for a long period before some of the fry hatched. The empty egg-membranes were thick and white and suspended in water and consequently they disturbed the scooping of the newly hatched fry, while the normal empty shells are very thin and nearly transparent and consequently do not disturb the scooping of the fry. If such a state of disease happened in an earlier stage than above, in the embryo development, the eggs gradually died and the dead eggs, living ones with the lessened turgidity and the ruptured contents from eggs were all jumbled together in masses. Moreover water molds were entangled in them. (Water molds grew about 4—5 cm. for 4 days in the feeding water at 8°.) Living eggs could not be selected from these masses. There was nothing to be done with such masses but to throw them away.

Whether egg-membranes are deteriorated by this disease or not, is easily detected with the naked eye from the advanced symptoms of the disease but hardly from the early symptoms unless a cross section of the membrane should be microscoped. If there were any physical method or any other by which the incipient stage of damage to eggs could be tested as soon as suspected, the hatchery operators might obtain many facilities for salmon propagation. It can be roughly foreknown that the disease will be in an incipient stage when the eggs are at the following stages:

(1) Many eggs in stacks will gradually die without any definite or suspected slip in the treatment and management.

(2) Less turgidity than normal is felt if the eggs are pinched with the fingers while in the water. (The eggs should not be pinched out of water.)

(3) There are many eggs which are crushed by being pressed under 1.5 kg. per egg.

The first and second cases explain themselves from the above descriptions. The reason in respect to the third case will be set forth.

As the membranes of the eggs which are seized with this disease are deteriorated from the outside, so the power of resistance of the damaged eggs ought to be less than that of the normal eggs. How much weight the normal salmon (sake) eggs can bear has never been discovered. There are only some experiments in our country, that is, when certain numbers of eggs were put under certain weights, no changes were recognized in the appearance of the eggs but the hatching progressed fairly well, or, in some cases, malformed or diseased fry were hatched (11). In Germany Hein has investigated the „absolute Druckfestigkeit der Bachforelleneier“ (12), but his results cannot be properly applied to the case of our salmon (sake) eggs. The „absolute Druckfestigkeit“ — absolute firmness to pressure — of our salmon (sake) eggs was then investigated.

The investigation was begun in order to find out the difference of resistance to pressure between sound and damaged eggs, at the Nishibetsu Hatchery, in early January, 1929.

The three eggs were laid on the vertices of the regular triangle drawn on an oak disk and a similar weighted oak disk was put on them and then weights were placed one by one on the latter disk until one egg would be crushed, carefully holding the upper disk so as not to let it slip. If even one of the three eggs was crushed in these experiments all of them were thrown away and three other eggs were newly taken and the experiment went on. Eighty seven eggs were used in this experiment of which 29 eggs were crushed. The strongest eggs bore more than 2.11 kg. while the weakest egg could not bear 0.57 kg. and the average amount of the weight which crushed the eggs would be 1.75 kg. per egg. Seven troughs received the eggs crushed with a heavier weight than the average, while the 3 ones received the eggs crushed with the lighter weight. Five eggs were at random picked from each trough and the cross section of their egg-membranes were made and examined to determine whether the egg-membranes were deteriorated. The result showed that the firmness to pressure of the salmon eggs was weak in the troughs which had been damaged. Then the 29 eggs were divided into two groups, one having those of the higher firmness than the average, 1.75 kg., and the other having those of lower firmness. There were 12 eggs having the lower firmness and their average firmness was 1.26 kg. There were 17 eggs having the higher firmness and their average firmness was 2.09 kg.

The firmness to pressure of the salmon eggs may vary according to individual eggs, individual parent fish, the spawning time and the stage of the embryo development. But if these factors were left out of consideration, the difference between the two groups is 0.8 kg. This difference would be caused by the deterioration of the egg-membrane. It is safe to say that the eggs which would be crushed with a weight of more than 2.0 kg. are sound and the ones which would be crushed by a weight less than 1.5 kg. are doubtless damaged.

First test (late February, 1929).

No.	Spawning Date	Testing Date	Elapsed days (days include the spawning day)	Average (min. and max.) Weight per egg (kg.)
1	25, XII, 1928	23, II, 1929 (the day preceding that on which fry would hatch)	61 days	2.49 (1.2—4.7)
2	30, XII, 1928	23, II, 1929	56 days	2.43 (1.0—4.6)
3	5, I, 1929	23, II, 1929	50 days	3.05 (1.6—5.6)
4	11, I, 1929	24, II, 1929	45 days	2.49 (1.6—3.6)
5	16, I, 1929	24, II, 1929	40 days	2.29 (1.3—3.2)
6	21, I, 1929	24, II, 1929	35 days	2.43 (0.8—3.6)
7	26, I, 1929	23, II, 1929	29 days	3.28 (1.6—4.7)
8	31, I, 1929	23, II, 1929	24 days	2.25 (4.1—2.8)
9	6, II, 1929	23, II, 1929	18 days	2.70 (1.6—4.1)
10	10, II, 1929	24, II, 1929	15 days	2.08 (0.8—3.6)
	Average			2.55 (0.8—5.6)

The absolute firmness to pressure is the highest when the egg-membranes are perfect but it will become week when the membrane becomes

deteriorated. What weight should the absolute firmness to pressure of the perfect eggs withstand? The absolute firmness to pressure of the sound eggs was investigated twice in February and March, 1929, at the Chitose Hatchery. The rice-tester devised by Prof. S. Tanaka, Tottori Agricultural College, was used. As the end of the screw of the tester which pressed the material was unfit for use, in the examination the egg to be tested was placed on the setting of the tester held lightly with a pair of tweezers used for egg-picking; also a piece of galvanized sheet iron was placed in position and the pressure was applied by means of revolving the upper screw until the egg was crushed. The 15 examined eggs were picked from each of the troughs which received eggs taken on every 5th day.

The absolute firmness to pressure of the eggs which were received in the troughs which the disease did not apparently attack, was investigated and it was found that the average absolute firmness of 150 eggs was 2.5 kg., the maximum 5.6 kg. and the minimum 0.8 kg. Thirty seven eggs among 150 had the absolute firmness to pressure of between 2.0 and 2.4 kg., 29 eggs between 2.5 and 2.9 kg., 27 eggs between 3.0 and 3.4 kg., and 24 eggs between 1.5 and 1.9 kg. A large majority (117 eggs) had an absolute firmness to pressure between 1.5 and 3.4 kg. and 137 eggs had a firmness above 1.5 kg.

The same sort of damaged eggs as were at the Nishibetsu Hatchery were at the Chitose Hatchery and their firmness to pressure was examined.

No.	Spawning Date	Testing Date	Elapsed days (days include the spawning day)	Average (min. and max.) Weight per egg (kg.)
1	17, I, 1929	24, II, 1929	39 days	1.93 (0.8—2.8)
2	16, I, 1929	24, II, 1929	40 days	1.37 (0.6—2.5)

The absolute firmness to pressure of the damaged eggs was weaker than that of the normal eggs.

Second test (March 11, 1929).

No.	Spawning Date	Remark	Elapsed days (days include the spawning day)	Average (min. and max.) Weight per egg (kg.)
1	10, I, 1929		61 days	2.81 (1.1—3.4)
2	11, I, 1929	No. 4 in the previous test.	60 days	2.05 (0.6—3.4)
3	15, I, 1929		56 days	1.69 (0.2—2.5)
4	16, I, 1929	No. 5 in the previous test.	55 days	1.53 (0.0—2.8)
5	21, I, 1929	No. 6 in the previous test.	50 days	0.80 (0.1—1.6)
6	26, I, 1929	No. 7 in the previous test.	45 days	2.30 (0.1—4.6)
7	31, I, 1929	No. 8 in the previous test.	40 days	1:74 (0.1—2.7)
8	4, II, 1929		36 days	1.73 (0.2—2.6)
9	6, II, 1929	No. 9 in the previous test.	34 days	2.11 (0.7—3.2)
10	10, II, 1929	No. 10 in the previous test.	30 days	0.96 (0.0—2.2)
	Average			1.71 (0.0—4.6)

The absolute firmness to pressure of the eggs which were tested in the second examination was on the whole not so strong as in the previous test.

The average absolute firmness of 150 eggs was 1.7 kg., the maximum 4.6 kg. and the minimum 0.0 kg.

Five eggs were picked from each of the troughs the eggs of which were tested for their absolute firmness, and their egg-membranes were microscopically examined as to whether they were deteriorated. The result was as follows:

No. at the 2nd test	Spawning Date	Remark	Average absolute Firmness (kg.)	
			The 1st test	The 2nd test
1	10, I, 1929	All 5 eggs sound.	—	2.81
2	11, I, 1929	3 eggs deteriorated.	2.49	2.05
3	15, I, 1929	All 5 eggs deteriorated.	—	1.69
4	16, I, 1929	All 5 eggs very much deteriorated.	2.29	1.53
5	21, I, 1929	All 5 eggs very much deteriorated.	2.42	0.80
6	26, I, 1929	All 5 eggs sound.	3.28	2.30
7	31, I, 1929	All 5 eggs sound.	2.25	1.74
8	4, II, 1929	All 5 eggs sound.	—	1.73
9	6, II, 1929	All 5 eggs sound.	2.70	2.11
10	10, II, 1929	All 5 eggs very much deteriorated.	2.08	0.96

Though the eggs which had been taken on the 31st January and 4th February were considered as sound eggs according to the microscopic examination, their firmness was very slight. Then on the next day their firmness was once more examined when the eggs were turned from the trays into the troughs and stirred to kill the unimpregnated eggs.

No.	Spawning Date	Remark	Elapsed days (days include the spawning day)	Average (min. a. max.) Weight per egg (kg.).
1	31, I, 1929	No. 8 in the 1st test, and No. 7 in the 2nd test.	41 days	2.04 (0.6—3.0)
2	4, II, 1929	No. 8 in the 2nd test; 20 eggs tested.	37 days	2.09 (0.5—3.8)

The average absolute firmness of 110 eggs in the troughs containing the eggs which were considered as sound eggs according to the microscopic examination (that is, No's. 1, 6, 7, 8 and 9 at the 2nd test; No's. 7 and 8 twice examined) was 2.1 kg., maximum 4.6 kg. and minimum 0.1 kg. Twenty nine eggs among them had an absolute firmness to pressure between 2.0 and 2.4 kg., 25 eggs between 1.5 and 1.9 kg., 13 eggs between 2.5 and 2.9 kg., and 14 eggs between 3.0 and 3.4 kg. A large majority (81 eggs) had an absolute firmness to pressure between 1.5 and 3.4 kg. and 85 eggs had a firmness above 1.5 kg.

The numbers of the eggs which had firmness to pressure at 0.5 kg. intervals may be recorded, as follows (p. 60).

The number of eggs with absolute firmness to pressure between 2.0 and 2.4 kg. is the largest of all and it can be said that the egg which has an absolute firmness to pressure above 1.5 kg., is sound. According to the above experiments it is known that the average firmness of eggs in the trough

Absolute firmness to pressure (kg.)	0.0—0.4	0.5—0.9	1.0—1.4	1.5—1.9	2.0—2.4	2.5—2.9	3.0—3.4	3.5—3.9	Above 4.0
Eggs in the 1st test (150 eggs) . . .	0	2	11	24	37	29	27	10	10
All the eggs in the 2nd test (185 eggs)	17	23	22	38	48	18	15	3	1
Sound eggs in the 2nd test (110 eggs)	4	9	12	25	29	13	14	3	1

which receives sound eggs is above 2.0 kg. If the average firmness to pressure is under 1.5 kg., the disease will doubtless attack the eggs in that trough. Whether all the eggs in a trough are attacked by the disease can be judged by no method. A microscopic examination can certainly judge the examined eggs themselves but it is only deduced from the result of the examination whether the other eggs in the same trough are attacked, or what the amount of damage will be in that trough. The judgment of the healthy condition of the eggs in the trough by means of the examination of the absolute firmness to pressure is also deduced from the result that is obtained by examining a few eggs in the same trough. Both methods are somewhat inconclusive. By the method recommended here one cannot tell the damaged eggs from the ruptured eggs (aufplatzende Eier) which Hofer reported (13) but the author's method is more rapid and simple than the microscopic examination.

Appendix 1. Increase in the absolute firmness to pressure after the impregnation of salmon eggs.

The newly spawned eggs which are not yet dipped in water are soft and easily crushed even between the fingers but if they are once dipped in water they become hard and are not easily crushed. The change of the absolute firmness to pressure (absolute Druckfestigkeit) of the eggs of the Bachforelle which were impregnated and dipped in water has been reported by Hein (12) but such an investigation on our salmon eggs has never been reported. Then the change in the absolute firmness to pressure of our salmon (O. Keta) eggs was investigated.

The eggs investigated were spawned and impregnated at the Shuwan Spawning House on the morning of the 6th January, 1930 and transferred to the Nishibetsu Hatchery, where the test was carried on. The first examination was held at 2.0 P. M. on the same day, about 5 to 6 hours after the impregnation. (Twenty eggs were tested at every time.)

No.	Lapse after impregnation	Average (min. and max.) weight per egg (kg.)
1	5 to 6 hours	0.62 (0.0—1.2)
2	26 to 27 hours	3.12 (1.4—5.4)
3	50 to 51 hours	3.16 (1.8—6.2)
4	74 to 75 hours	3.21 (1.2—6.0)

The absolute firmness rapidly increases after the impregnation and dipping in water, and reaches more than 3.0 kg. after the lapse of 26 to 27 hours, and then the strength of the absolute firmness seems to continue until a late stage of the embryo development.

Appendix 2. The absolute firmness to pressure of the eggs out of which fry will hatch in the near future.

The absolute firmness to pressure of the eggs out of which fry would hatch on the next day was investigated at the Chitose Hatchery and the results have been described above.

In the "Report of the Hokkaido Fishery Experimental Station" (14) is the following description. "If the embryo fish have already grown and will soon be at the hatching time, the color of the eggs which has been whitish opaque, rapidly becomes more and more partly transparent and at last the embryo fish is seen through the thinned egg-membrane. Then the embryo fish easily breaks the thinned membrane and hatches out. The change of the egg-membrane at the hatching time happens very rapidly. The hatching takes place after the lapse of 20 minutes in the rapid cases after a slightly visible change is seen in the egg-membrane, the most part of which becomes transparent, after the lapse of 3 hours in the slow cases and generally after the lapse of 1.5 hours." According to this the egg-membrane becomes thinner and thinner for several hours before the hatching time, and consequently the absolute firmness to pressure of the eggs at such a stage of the embryo development will gradually decrease and the change of the absolute firmness might be interestingly but impossibly investigated. For, when fry will hatch out of the crushed eggs is obscure. Hence the absolute firmness to pressure of the eggs at such a stage was not tested. [But Tanaka tested it with a tester devised by himself (15).]

Appendix 3. The absolute firmness to pressure of the embryo-sac of the hatching fry.

The embryo-sac of the embryo fish in eggs whose eyes have colored has become complete, hence if the absolute firmness of the embryo-sac should be large enough to be tested it should prove to be greater than that of the eggs whose eyes have not yet colored. Then the absolute firmness to pressure of the embryo-sac of the hatching fry was tested at the Chitose Hatchery. The samples in the following condition were selected from the trough where the hatching of fry was taking place: The egg-membrane had thinned and burst but the embryo fish did not protrude any part of the body and the embryo-sac was still circular.

Spawning Date	Testing Date	Elapsed Days	Average (min. and max.) weight per fry (kg.)
25, XII, 1928	24, II, 1929	62 days	0.01 (0.0—0.2)

The absolute firmness to pressure of the embryo-sac of the hatching fry is nearly zero. Hence it is thought that the absolute firmness of the embryo-sac of the embryo fish at an early stage of the embryo development is even smaller. The firmness of the embryo-sac is negligible and hardly influences the firmness of the eggs whose eyes have colored and at the latter stage the firmness is caused only by the egg-membrane and the same is true in regard to the firmness of the eggs whose eyes have not yet shown color.

The absolute firmness to pressure of the salmon eggs at various stages of the embryo development was tested at both the Chitose and Nishibetsu hatcheries. The race of salmon which ascend the Ishikari River and are

caught at the Chitose Hatchery may be different from the race which ascend the Nishibetsu River and are caught at the Nishibetsu Hatchery. However, at both hatcheries the average duration of the egg stage is 62 days including the spawning and hatching days, during which the mean water temperature is about 8°. Then the absolute firmness to pressure would be arranged in the order of the stage of the embryo development as follows:

The lapse of time (stage)[1]	The absolute firmness to pressure (kg.)	Healthy condition	Hatchery	Remarks
5—6 hours	0.62	healthy	Nishibetsu	
26—27 ,,	3.12	,,	,,	
50—51 ,,	3.16	,,	,,	
74—75 ,,	3.21	,,	,,	
14 days	2.08	,,	Chitose	
17 ,,	2.70	,,	,,	
23 ,,	2 25	,,	,,	
28 ,,	3.28	,,	,,	
29 ,,	0.96	damaged	,,	
33 ,,	2.11	healthy	,,	
34 ,,	2.43	,,	,,	
35 ,,	1.73	,,	,,	The same trough
36 ,,	2.09	,,	,,	
38 ,,	1.93	damaged	,,	
39 ,,	2.29	healthy	,,	
39 ,,	1.37	damaged	,,	
39 ,,	1.74	healthy	,,	The same trough
40 ,,	2.04	,,	,,	
44 ,,	2.49	,,	,,	
44 ,,	2.30	,,	,,	
49 ,,	3.05	,,	,,	
49 ,,	0.80	damaged	,,	
54 ,,	1.53	,,	,,	
55 ,,	1.69	,,	,,	
55 ,,	2.43	healthy	,,	
59 ,,	2.05	damaged	,,	
60 ,,	2.49	healthy	,,	
60 ,,	2 81	,,	,,	
61 ,,	0.0		,,	Embryo-sac of the hatching embryo fish

[1]) The spawning day is not included.

If the absolute firmness to pressure which was obtained from the sound eggs is traced, the following curve is obtained:

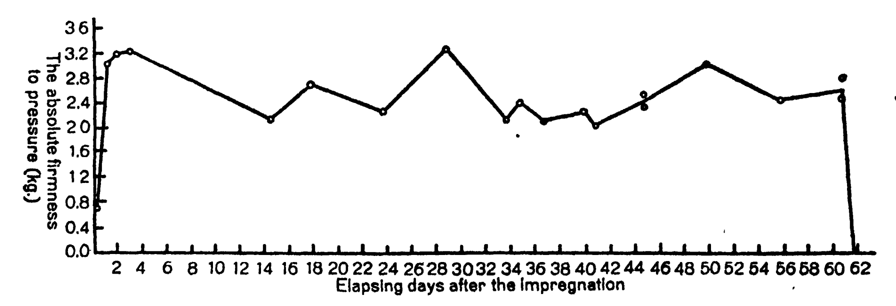


Fig. 1. The absolute firmness to pressure of the salmon (O. keta) eggs at various stages of development.

The absolute firmness to pressure rapidly increases after impregnation and dipping in water. It reaches more than 2 kg. and afterwards the strength seems to continue until several hours before the fry hatch. On the threshold of hatching, unicellular glands of the embryo fish secrete the hatching enzyme (14), which digests the egg-membrane of its inner part and consequently the absolute firmness of the eggs becomes weaker and weaker, and at last the egg-membranes become so weak that the embryo fish can easily tear them by their movements.

The change of the absolute firmness to pressure of our salmon eggs for the duration of the egg stage, obtained by these experiments, is different from that which Hein (12) obtained using the eggs of „Bachforelle". If the result of Hein's experiments are true, the eggs become more and more fragile due to various accidents during the natural hatching as the stage of the embryo development is advancing after the eyes have colored. This seems to be unnatural while on the contrary, the eggs will actually be protected by the maintenance of the invariable and strong absolute firmness until the threshold of the hatching is reached, when the hatching enzyme which is secreted from the unicellular glands digests the egg-membrane from the inner part to make the fry hatch easily.

It is finally concluded that: As the egg-membrane is not digested until the threshold of the hatching and in the damaged eggs it is deteriorated by bacteria at any stage of the embryo development, if the absolute firmness to pressure of some of the eggs in any trough is tested at any time except the spawning and hatching days and the weak average absolute firmness under 1.5 kg. is obtained, the other eggs in the trough will be recognized as the damaged eggs, that is, those attacked by this disease.

Résumé.

1. The damage to the salmon (O. keta) eggs which happened at the Nishibetsu (at present called the Nijibetsu) Hatchery in the spring of 1928, was studied from the bacteriological standpoint.

2. The water used at the hatchery contained more bacteria than that used at the other hatcheries. Then the cause of the damage was presumed to be bacteria.

3. It was known that the damage was prevented by using the bored well water containing few bacteria as the feeding water.

4. Most of the gelatin liquefying bacteria which were isolated from the damaged eggs killed the salmon eggs.

5. The bacteria which killed the eggs made the water very turbid.

6. The egg-membrane was deteriorated from the surface by bacteria when the eggs were attacked by this disease, and consequently the damaged eggs lost their characteristic turgidity. Hence the disease may be named the soft egg disease or the egg-membrane sore.

7. It was regrettable that the damage which occurred in the egg-troughs could not be imitated by the infection of the isolated bacteria to the sound salmon eggs.

8. As the disease attacks the egg-membrane and consequently the absolute firmness to pressure of the affected eggs becomes weaker and weaker, it can be determined by the test of the absolute firmness to pressure whether the eggs will be affected.

Literature.

(1) Saito, M., On the Softening of Salmon Egg-membrane. [Journ. of Salmon Propagation (Keison Yiho). Vol. 2. 1930. No. 3. p. 7—10.] (Japan.) — 2. The State of Damage to the Sake Eggs at the Nishibetsu Hatchery. Part III. (Bull. Hokkaido Fish. Exper. Stat. No. 25. May 1928. p. 7—9.) — (3) Hofer, B., Handb. d. Fischkrankheiten. 1906. S. 256. Plehn, M., Praktikum d. Fischkrankheiten. 1924. S. 441. — (4) Davis, H. S., Care and Diseases of Trout. 1929. p. 168. Bureau of Fisheries Document. No. 1061. Dept. of Comm., Bur. of Fish., U. S. — (5) The state of Damage to the Sake Eggs at the Nishibetsu Hatchery (the 3rd business year of the Showa, 1928). Part I. [Bull. Hokkaido Fish. Exper. Stat. No. 48. (November, 1928.) p. 6—10.] — (6) Hanzawa, J., Investigation of the State of the Damage of the Sake Eggs at the Nishibetsu Hatchery. Part VII. [Bull. Hokkaido Fish. Exper. Stat. No. 31. (July, 1928.) p. 6—8.] — (7) The State of Damage to the Sake Eggs at the Nishibetsu Hatchery. [Bull. Hokkaido Fish. Exper. Stat. No. 23. (April, 1928.) p. 3—6.] — (8) Aoyama, G., On the Well-sinking at the Nishibetsu Hatchery. [Journ. Salmon Propagation (Keison Yiho). Vol. 3. 1931. No. 2. p. 2—7.] — (9) Sekino, H., On Mr. M. Saito's Paper "On the Softenning of the Egg-membrane of the Salmon eggs". [Journ. Salmon Propagation (Keison Yiho). Vol. 2. 1930. No. 4. p. 1.] (Japan.) — (10) Takeda, Sh., On the Cause of the Salmon Egg Disease recently occurring at the Hatcheries in Hokkaido. [Journ. Salmon Propagation (Keison Yiho). Vol. 2. 1930. No. 5—6. p. 1.] (Japan.) — (11) Kobayashi, K., The Study on the Resistance of Sake Eggs to Pressure. [Journ. Salmon Propagation (Keison Yiho). Vol. 4. 1932. No. 3. p. 1—5; and Utsumi, J., Audience. — (12) Hein, W., Zur Biologie der Forellenbrut. II. Über die absolute Druckfestigkeit der Bachforellen-Eier. (Allgem. Fisch.-Zeitung. Jahrg. 32. 1907. S. 334.) — (13) Hofer, B., Über das krankhafte Aufplatzen von Fischeiern. (Allgem. Fisch.-Zeitung. Jahrg. 25. 1899. Neue Folge: Bd. 14. S. 146; Handb. d. Fischkrankheiten. 1906. S. 258.) — (14) The hatching Mechanism of Salmon Fry. The 3rd Report of the Hokkaido Fish. Exper. Stat. 1910. p. 524. (Japan.) — (15) Tanaka, R., The Usage of Formalin in the Fish Hatching. (Mimeographed. 1932.) (Japan.)

Die Agglutination der Backhefe durch Lactococcus agglutinans.

[Aus dem zentral-wissenschaftlichen Forschungs-Laboratorium für Gärungsgewerbe.]

Von **E. A. Plewako** und **O. A. Bakuschinskaja**, Moskau.

Mit 6 Abbildungen im Text.

Die Agglutination der Hefe — d. h. das Zusammenballen der Zellen zu großen, sich schnell zu Boden des Gärbottichs setzenden Flocken — ist eine Erscheinung, welche jährlich in mehreren Preßhefefabriken der USSR stattfindet. Ungeachtet der großen Menge wissenschaftlicher Arbeiten bezüglich der Ursachen und des Wesens dieser Erscheinung, herrschten hierüber bis jetzt noch große Meinungsverschiedenheiten. Von westeuropäischen Forschern werden verschiedene Theorien vertreten, welche das Wesen der Agglutination zu erklären sich bemühen. Die Anhänger der enzymatischen Theorie behaupten, es trete eine Störung der normalen Entwicklung der Zelle ein, verursacht durch eine Verarmung der proteolytischen Fermente, wodurch eine gewisse Menge der Eiweißstoffe der umkreisenden Lösung ungelöst bleiben und die Hefenmembran umhüllen soll. Dabei finde eine Verklebung der Zellen statt.

Andere Forscher schreiben die Agglutination der Hefe einer Veränderung der elektrischen Ladung der Zellen zu, welche bei der elektrischen

Neutralität, dem sog. isoelektrischen Punkt, eintritt. Dabei werden die Hefezellen voneinander angezogen und bilden Flocken. Außerdem sind auch die eiweißhaltigen Partikelchen der Würze elektrisch geladen, und zwar der Hefezelle gegenüber entgegengesetzt; infolgedessen werden sie von den Hefezellen angezogen, verschleimen dieselben und kleben sie zusammen. Jedoch hängt die elektrische Ladung der Hefezellen von der Wasserstoffionenkonzentration ab: bei einem hohen p_H ist die Hefe elektrisch-positiv geladen und erst bei einem p_H unterhalb 3,8 bekommt sie eine negative Ladung. Letztere Theorie kann offenbar keineswegs zur Erklärung des Wesens der Agglutination bei der Preßhefefabrikation herangezogen werden. Obwohl Malkow und Petina bei ihren Versuchen mit Backheferassen eine Agglutination erst bei einem $p_H = 2,8$ beobachten konnten, tritt sie jedoch in der Praxis bei der Fabrikerzeugung von Backhefe, wo ein p_H von 4,5—5,5 innegehalten wird, regelmäßig auf. In ein und derselben Fabrik, welche nach einem gleichen technologischen Schema arbeitet, kann man zuweilen gar keine Agglutination nachweisen, zuweilen tritt sie jedoch stark auf.

Eine Anzahl deutscher Forscher, wie z. B. Henneberg und Wagner, schreiben die Agglutinationserscheinung der Mitwirkung von Mikroorganismen zu. Malkow betrachtet als Ursache der Agglutination der Hefe eine Störung ihrer normalen Entwicklung, welche durch die Stoffwechselausscheidungen von Mikroorganismen verursacht sein kann.

Die deutschen Forscher vereinigen gewöhnlich die ganze Gruppe der agglutinierenden Bakterien unter der Bezeichnung „flockenbildende Milchsäurebakterien". Sie verursachen das Zusammenkleben der Hefezellen, rufen eine Störung ihrer Stoffwechselfunktionen und gegebenenfalls selbst ihren Tod herbei (Henneberg). Die kulturellen und morphologischen Anzeichen solcher Bakterien, welche in verschiedenen Backhefefabriken zu verschiedenen Zeiten abgesondert wurden, sind von deutschen Forschern genau beschrieben worden.

Was die Agglutinationserscheinung in den Backhefefabriken der USSR, welche ein bakteriologisch wenig erforschtes Rohmaterial — die Zuckerrübenmelasse — anwenden, anbelangt, so liegen hierüber bis jetzt keine Untersuchungen vor. Um die Ursache dieser Erscheinung kennenzulernen, wurden die Arbeitsverhältnisse der Moskauer Backhefefabrik Nr. 1 öfters verfolgt: die Rohstoffe, die Kultur-Abteilung, die Gärbottiche, die Handelsware wurden genau untersucht, sobald die Agglutinationserscheinung im Fabrikationsgang auftrat. Außerdem wurden auch in der Versuchsanstalt für Preßhefefabrikation des zentralen Gärungslaboratoriums zu Moskau die Agglutinationserscheinungen gründlich studiert.

Andererseits wurden auch Melassemuster, welche von verschiedenen Backhefefabriken zugesandt wurden, untersucht und zwar solche Muster, welche von Fabriken stammten, wo keine Agglutination stattgefunden hatte, und solche, wo diese Erscheinung aufgetreten war (s. Tab. 1).

Die entnommenen Proben der Rohstoffe, der Würze aus den Gärbottichen und der fertigen Ware wurden in 100- und 1000facher Verdünnung auf Würze-Agar (6° Blg) + 2% Kreide in Petrischalen geimpft. In einem solchen Nährmedium traten immer nach 48 Std. bei 37° C säurebildende Bakterien auf, und zwar zwei Kolonienarten: glatte, halbdurchsichtige und hohe weißliche, von einer durchsichtigen Zone umrahmte. Aus den Petrischalen wurden diese Kolonien in treberhaltige Maische (6° Blg), welche einen Kreidezusatz erhalten hatte, übergeimpft. Nach 24stünd. Stehen bei

Tabelle 1.

Rohstoffmelasse			
Datum der Untersuchung	Forschungsobjekt	Anwesenheit des Lactoc. agglutinans	Vorhandensein der Agglutination
1	2	3	4
4. IV. 34	Melasse der Moskauer Backhefefabrik Nr. 1 aus Sametschino bezogen	+	+
23. VI. 34	Melasse der Moskauer Backhefefabrik Nr. 1 dem großen Behalter entnommen . . .	—	—
26. VI. 34	Melasse der Backhefefabrik zu Kursk. .	+	+
27. VI. 34	Melasse der Witebskschen Backhefefabrik	—	—
28. VI. 34	Melasse der Moskauer Versuchszuckerfabr.	—	—

Gärbottiche				Fertige Ware		
Datum d. Untersuchung	Forschungsobjekt	Anwesenheit d. Lactoc. agglutin.	Vorhandensein d. Agglutination	Datum d. Untersuchung	Forschungsobjekt	Anwesenheit d. Lactoc. agglutin.
1	2	3	4	1	2	3
11. V. 1934	Mosk. Backhefefbr. Nr. 1, Kulturabt. Bottich	+	+	11. V. 1934	Mosk. Backhefefabr. Nr. 1, Preßhefe	+
11. V. 1934	Nr. 3, I—e Gärstufe	—	—	13. VII.	Preßhefe . . .	+
11. V. 1934	Endvergärung . .	+	+	16. VII. 1934	Hefekonzentr. sofort nach dem Separieren . .	+
13. VII. 1934	Anfangsgärstufe .	+	+	16. VII. 1934	Hefe d. Filterpresse entnommen	+
13. VII. 1934	Anstellhefe, d. Separator entn.. .	+	+			
13. VII. 1934	Endvergärung . .	—	—			
16. VII. 1934	Anfangsgärstufe im obenstehenden Gärbottich . .	+	+			
16. VII. 1934	Endvergärungsstadium im unteren Garbottich . .	+	+			

30° oder bei 37° C trat in diesem Nährmedium Kohlensäure-Ausscheidung auf (s. Tab. 1). In den Stämmen, welche den verschiedenen Kolonien ein und desselben Materials entnommen waren, sowie in den Stämmen, welche aus verschiedenen Rohstoffen abgesondert waren, konnte man bei einer weiteren Untersuchung keine Unterschiede weder in morphologischen noch in kulturellen Anzeichen feststellen. Die Größe der Säurebildung in treberhaltiger Maische als Nährboden zeigt erhebliche Unterschiede bei ein und demselben Stamm, je nach der Züchtungsmethode, der Zahl der Überimpfungen, der Aufbewahrungstemperatur usw. Die Untersuchung einer großen Menge von Stämmen hat uns zu der Überzeugung geführt, daß bei der Agglutination in der Melassehefe-Fabrikation sich ein und derselbe Mikroorganismus absondern läßt, der folgendermaßen bakteriell zu charakterisieren ist:

Bakteriologische Untersuchungen.

Der Erreger der Hefen-Agglutination repräsentiert morphologisch ein kurzes, ziemlich dickes Stäbchen von Bisquitform mit abgerundeten Enden, meist einzeln oder zu zwei verteilt, zuweilen in Kettenform angeordnet oder in Gruppen angesammelt, bestehend aus mehr als 10 Individuen. Die Bakterienzellen sind von einer schleimigen Kapsel umkleidet. So sehen sie aus nach ihrem Wachstum auf Würze-Agar (6° Blg) + 2% Kreide (s. Abb. 1 a, b). In flüssigen Nährböden dagegen, speziell auf Würze (6° Blg) mit Trebern, und Kreide in Hefenwasser mit 5—10% Saccharose, ist die Fähigkeit dieses Mikroorganismus, morphologische Abweichungen von der charakteristischen Form zu liefern, bemerkenswert: so erscheinen neben einer großen Menge der oben beschriebenen Stäbchen, verlängerte Stäbchen, öfters in Ketten angesammelt und selten lange Fäden, zuweilen kann man auch Formen ohne Kapseln bemerken: eine solche Variabilität tritt in jungen, 1—5tägigen Kulturen auf. Die Höchstdimensionen einzelner Bakterien betragen 2,5 × 0,7 μ, der überwiegende Teil besitzt eine Größe von 0,8 × 0,4 bis 1,5 × 0,5 μ. Das Stäbchen ist unbeweglich, es bildet keine Sporen, gibt eine grampositive Färbung. Eine Würze mit Trebern und Kreide sieht nach 24 Std. trübe aus und besitzt eine schleimige Konsistenz; es bilden sich große Säuremengen. Nach einer gewissen Zeit wird das Nährmedium flüssig und durchsichtig. Man bemerkt bakterielle Flocken. Ohne von neuem übergeimpft zu werden, kann die Kultur ca. 1½ Monate aufbewahrt werden.

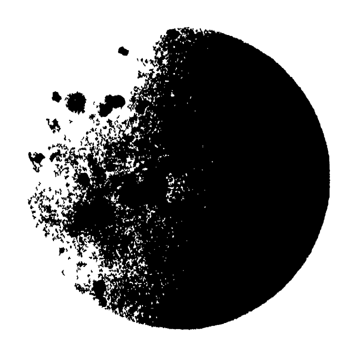


Abb. 1. Vergrößerung 300×.

Der in Frage stehende Mikroorganismus ist fakultativ-anaerob. Unter aeroben Bedingungen gedeiht er schneller. Gelatine wird von ihm nicht verflüssigt. In Nitratmedien gibt er Spuren von Nitriten. In dünnen Medien mit verschiedenen Zuckerarten ohne Kreide beträgt die Säurebildung nach 48 Std. bis 0,3° D und kann innerhalb 10 Tagen 2,5° D erreichen.

Wie aus der Tabelle 2 zu ersehen ist, ziehen die Bakterien die Saccharose, Glukose, Laktose und Maltose vor, weniger gut werden Galaktose und Lävulose verwendet und noch schlechter Mannit und Xylose.

Bei Strichimpfung auf Würze-Agar bei 30° C bemerkt man nach 48 Std. ein glasperlenartiges, flaches und mattes Wachstum, der Nährboden bleibt farb- und geruchlos.

Tabelle 2. Säurebildung auf Nahrmedien mit verschiedenen Zuckerarten.

Saccharose	Glukose	Mannose	Galaktose	Mannit	Maltose	Xylose	Lavulose
0,3° D	0,3° D	0,3° D	0,2° D	0,15° D	0,3° D	0,1° D	0,2° D

Anmerkung: Die Versuche wurden auf Hefewasser mit 2% der genannten Zuckerarten mit Bromkresolpurpur als Indikator angestellt.

Eine Impfung auf Hefewasser-Agar + 4 % Saccharose gibt bei der gleichen Temperatur ein ähnliches Wachstum wie auf Würze-Agar.

Bei einer Gelatine-Stichkultur bemerkt man ein größeres Wachstum von oben und in der Stichrichtung; die Form des Wachstums ist glasperlenförmig.

Auf Bouillon erfolgt bei 30—37° fast gar kein Wachstum, in 2 tägigen Kulturen erscheint eine leichte Trübung, wird jedoch dem Nährmedium Zucker zugefügt, so vergrößert sich das Wachstum. Die Bouillonkultur bleibt geruchlos.

Die Kolonien auf Würze-Agar wachsen langsam, sie sind klein, punktförmig, mit einer glatten Oberfläche, mit glattem Rand, amorpher Struktur, flach, fast farblos. Die Kolonien auf Hefewasser-Agar + 4% Saccharose weisen keine Unterschiede gegenüber dem Würze-Agar auf, sind jedoch weißlicher. Auf Würze-Agar mit 2% Kreide wachsen die Kolonien ebenfalls langsam; nach 48 Std. erscheint eine die Kolonie umrandende klare Zone (s. Abb. 2). Auf diesem Nährmedium erscheinen 2 typische Kolonien: 1. kleine, ca. 1 mm im Durchmesser, halbdurchsichtige, etwas opaleszierende, flache, glatte mit glattem Rand und 2. über 1 mm im Durchmesser große kompakte, nicht durchsichtige Kolonien, säulenförmig nach oben wachsend, glattrandig mit matter Oberfläche und amorpher Struktur.



Abb. 2. Vergrößerung 600×.

Die Bakterien in den Kolonien beider Typen sind sowohl nach ihren morphologischen als auch biochemischen Merkmalen gleichartig.

Milch gerinnt nach 24 Std. (eine saure Gerinnung), es erfolgt keine Peptonisierung.

Wachstums-Temperaturoptimum 30—35° C, maximale Wachstumstemperatur 40° C, minimale Wachstumstemperatur 2° C.

Indol wird nicht gebildet, ebenso nicht Schwefelwasserstoff. Die Bakterien wachsen vorzugsweise bei einem $p_H = 4{,}6-7{,}2$; sie wachsen auch bei p_H 3,5—4,6, befinden sich im unterdrückten Zustande bei p_H 2,8 und 8,0, bei p_H = 1,2 und 9,0 erfolgt kein Wachstum (s. Tab. 3).

Tabelle 3. Der Einfluß des p_H des Nährmediums auf das Wachstum des Lactococcus agglutinans.

p_H:	3,1	3,4	3,6	4,0	4,4	4,6	5,1	6,1	7,2	8,0
Lactococcus agglutinans	—+	—+	+	+	+	++	++	++	++	—+

Anmerkung: Man gelangte zu einem sauren p_H durch Zusatz von Milchsäure, zu einem alkalischen p_H durch Zusatz von NaOH.

Die biochemischen Eigenschaften der abgesonderten Mikroorganismen wurden auf einem Nährmedium bestehend aus Hefewasser + 4% Saccharose studiert.

Die Versuche wurden unter aeroben und anaeroben Bedingungen ausgeführt. Im ersten Fall wurde die Nährflüssigkeit flach in einen geräumigen Erlenmeyer-Kolben (von ca. 1 l Inhalt) ausgegossen; im zweiten Fall gelangte sie in einen Rundkolben mit 300 ccm Inhalt. Zuerst wurden 250 ccm der Nährlösung sterilisiert, wonach sie mit 0,1 ccm einer auf derselben Nährlösung vorbereiteten Reinkultur des Bakteriums geimpft wurde und darauf-

hin wurden mit einer Mohrschen Pipette noch 50 ccm der gleichen, aber gesondert vorbereiteten Nährlösung zugeführt.

Die Versuche wurden sowohl mit als ohne Kreidezusatz angestellt. Die Kolben verblieben im Thermostaten 10 Tage lang bei einer Temperatur von 27° C.

Tabelle 4 (ohne Kreide).

Versuchsbedingungen	Kolben Nr.	Zuckergehalt vor dem Versuch in g	nach d. Versuch in g	ausgenutzt in g	in %	p_H vor dem Versuch	nach d. Versuch	Säuremenge vor dem Versuch	nach d. Versuch °
Aerob	1	4,55	3,46	1,09	24	5,8	2,8	0,05	2,5
Aerob	1a	4,55	3,47	1,08	23,8	5,8	2,8	0,05	2,4
Anaerob . . .	2	4,55	3,17	1,38	30	6,0	3,0	0,05	2,19
Anaerob . . .	2a	4,55	3,4	1,15	25,3	6,0	3,0	0,05	2,37

Anmerkung: Die Angaben beziehen sich auf 100 ccm.

Tabelle 5 (mit Kreide).

Versuchsbedingungen	Kolben	Zuckergehalt vor dem Versuch in g	nach d. Versuch in g	ausgenutzt in g	in %	p_H vor dem Versuch	nach d. Versuch	Säuremenge vor dem Versuch	nach d. Versuch °
Aerob	3	4,55	2,16	2,39	52	5,8	5,0	0,05	8,1
Aerob	3a	4,55	1,82	2,73	60	5,8	5,2	0,05	7,2
Anaerob . . .	4	4,55	2,67	1,88	41	6,0	4,0	0,05	4,0
Anaerob . . .	4a	4,55	2,51	2,04	48	6,0	4,2	0,05	5,0

Anmerkung: Die Angaben beziehen sich auf 100 ccm.

Tabelle 6 (mit Gärverschluß nach Meißl).

Versuchsbedingungen	Flüssigkeitsmenge	Gewichtsabnahme nach 5 Tagen
Aerob	100 ccm	0,013
Anaerob	100 ccm	0,026

In den Versuchskolben wurde der Zuckergehalt vor und nach dem Versuch nach Bertrand ermittelt, der p_H kolorimetrisch nach Michaelis, die Gesamtsäure durch Titrierung mit $^1/_{10}$ n NaOH (Phenolphtalein als Indikator) und in den Fällen, wo Kreide angewandt war, durch Titrierung mit $^1/_{10}$ n HCl (Methylviolett als Indikator) (s. Tab. 4 u. 5). Eine Reihe von Versuchen erfolgte nach Meißl mit periodischen Wägungen, um die entwickelte Kohlensäuremenge durch Abnahme des Gewichtes festzustellen (s. Tab. 6).

Aus der Tabelle 5 ersieht man, daß unter aeroben Bedingungen etwas mehr Zucker ausgenützt wird als unter anaeroben Bedingungen. Im ersten Fall verminderte sich die Zuckermenge in der Nährflüssigkeit bis 60%, im anaeroben Fall bis 48%.

Die Säurebildung in den Versuchen ohne Kreide stockt bei einem p_H = 2,8—3,0, die Säureanhäufung erreicht 2,1—2,5° D. In Gegenwart von

Kreide ist die Säureanhäufung innerhalb von 10 Tagen eine viel größere (vgl. Tab. 4 u. 5). Die Kohlensäure-Ausscheidungen blieben sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Verhältnissen unbeträchtlich (s. Tab. 6).

Was die Säurebildung anbelangt, so bemerkt man bei diesen Mikroorganismen — wie bereits schon früher erwähnt wurde — eine größere Empfindlichkeit den sich in der Gärflüssigkeit ansammelnden Säuremengen gegenüber als bei vielen bekannten Stämmen von milchsäurebildenden Bakterien, welche schnell Säuremengen von 3,0—3,2° D anhäufen. Die in Frage stehenden Mikroorganismen sammeln aber nur langsam Säuremengen an, welche 2,5° D nicht übersteigen. Diese Erscheinung hat uns auf den Gedanken geführt, daß vermutlich in der Nährflüssigkeit irgendwelche flüchtige Bakterien-Stoffwechselprodukte zugegen sein können, welche die Bakterienzellen nachteilig beeinflussen. Infolgedessen wurde eine Reihe von Versuchen angestellt, in denen der Alkohol nach der Mikromethode von Fred und Peterson bestimmt wurde, der Azetaldehyd-kolorimetrisch und die flüchtigen Säuren von den nichtflüchtigen durch Destillation getrennt. Die Menge der nichtflüchtigen durch Titration bestimmten Säuren stimmte mit der Menge Milchsäure überein, welche nach der Aldehyd-Methode gefunden worden war. Andere flüchtige Säuren und Stoffwechselprodukte wurden nicht vorgefunden.

Von der Gesamtmenge flüchtiger Säuren besteht ein Teil aus Essigsäure, ein anderer Teil aus Ameisensäure, was sowohl durch die qualitative Prüfung mit $AgNO_3$ als auch die quantitative Bestimmung bestätigt worden ist.

Bei der Analyse der Kulturflüssigkeiten, in welchen das Bakterienwachstum ohne Kreide erfolgte, und zwar unter anaeroben als auch unter aeroben Bedingungen, konnte festgestellt werden, daß die Lebenstätigkeit der Bakterien infolge der Säurebildung unterdrückt worden war und sie nützten bloß 25—30% der Zuckermenge aus. Unter den Stoffwechselprodukten konnten nur Milchsäure und Spuren von Aldehyden und Alkohol nachgewiesen werden. In Gegenwart von Kreide unter anaeroben Bedingungen wurde außer einer beträchtlichen Menge Milchsäure, Spuren von Ameisensäure festgestellt, unter aeroben Bedingungen bildeten sich Alkohol und größere Mengen flüchtiger Säuren, unter welchen sich die Ameisensäure in beträchtlichen Mengen vorfindet (s. Tab. 7).

Ohne auf den Chemismus des Zucker-Ausnützungsprozesses bei diesen Mikroorganismen einzugehen, muß ihre Fähigkeit hervorgehoben werden, flüchtige Säuren und unter ihnen die Ameisensäure nur unter aeroben Bedingungen zu bilden, was wahrscheinlich die schädliche Wirkung dieses Mikroorganismus auf die Hefenzellen während der Lüftung verstärkt.

Tabelle 7.
I. Serie (in 100 ccm Nährflüssigkeit).

Nr. Folge	Versuchsbedingung	Saccharose in g vor %	nach %	verbraucht %	Gesamtsaure in ccm $^1/_1$ n. NaOH in 100 ccm	Milchsäure in g in 100 ccm	Äthylalkohol in g in 100 ccm	Aldehyd
1	Aerob, ohne Kreide	4,55	3,47	1,08	9,84	0,8856	0,0315	Spuren
2	Anaerob, ohne Kreide	4,55	2,67	1,88	9,14	0,8324	nicht vorhanden	Spuren

II. Serie (in 100 ccm der Nährflussigkeit).

Nr. Folge	Versuchsbedingung	Saccharose in g vor %	Saccharose in g nach %	Saccharose in g verbraucht %	Milchsäure nach der Aldehydmethode %	Flücht. Sauren Essigsaure %	Flücht. Sauren Ameisensaure %	Alkohol	Aldehyd
3	Aerob, mit Kreide	4,55	1,82	2,73	1,96	0,12	+	0,089	Spuren
4	desgl.	4,55	2,16	2,39	1,7068	0,096	0,014	0,118	Spuren
5	Anaerob mit Kreide	4,55	2,67	1,88	1,8182	0,029	+	nicht vorh.	Spuren

Anmerkung: In den Versuchen 1 und 2 wurde die Milchsäuremenge bei der Bestimmung nach der Aldehydmethode nach der Menge $^1/_1$ n. NaOH, welche bei der Titration der Gesamtsäure verbraucht war, berechnet; aus diesem Grunde wurden die flüchtigen Säuren in diesen Versuchen nicht festgestellt. In den Versuchen 3, 4, 5 wurden die flüchtigen Sauren mit Wasserdampf abdestilliert, wobei in den Versuchen 3 und 5 die Ameisensäure qualitativ mittels der Reaktion mit $AgNO_3$ bestimmt wurde, da ihre Menge sich nur in Spuren vorfand. Die fluchtigen Sauren sind in Grammmengen Essigsäure angegeben.

In dem Versuch 4 wurde die Ameisensauremenge durch die Differenz in ccm $^1/_1$ norm. NaOH bei der Titration der flüchtigen Sauren festgestellt, nachdem die Ameisensaure durch eine Chrommischung vernichtet worden war.

In Anbetracht der Entwicklung der Lehre uber die Variabilität der Bakterien, über die Dissoziation derselben ist es wohl kaum möglich, die Bestimmung der Mikroorganismen auf Grund nur einiger morphologischer und kultureller Anzeichen durchzuführen. Infolgedessen ist es auch nicht möglich, unter Berücksichtigung der in der Literatur vorkommenden Beschreibungen über „flockenbildende Milchsäurebakterien" eine Vorstellung über die Menge der in Wirklichkeit existierenden Arten zu gewinnen. In unserer Bakterienkollektion fehlen die von verschiedenen Autoren isolierten Stämme: Bact. Listeri, Bact. utile, Rasse H, Lactobacillus conglomeratus, Bact. Matthesi, Lactococcus agglutinans. Dieser Umstand verhindert die Möglichkeit einer Identifizierung unserer Mikroorganismen mit den früher isolierten, was wir uns zur Aufgabe einer ferneren Untersuchung machen. Von den morphologischen Anzeichen des von uns isolierten Stammes sei seine Tendenz hervorgehoben, bisquitähnliche Formen anzunehmen mit einer charakteristischen Kapsel und Stäbchen verschiedener Größe zu bilden. In der Variabilität dieser Formen und dem Vorhandensein von Diplokokkenformen nähert sich diese Bakterienart den Leukonostoc-Arten, von welchen sie sich nur durch größere Dimensionen unterscheidet. Von den biochemischen Kennzeichen ist für diesen Stamm die Fähigkeit, die Laktose und mit Vorliebe die Maltose zu vergären, charakteristisch. Dabei bildet sich in Nährlösungen aus Würze mit Trebern und Kreide eine zähe Konsistenz des Nährmediums, was auch Beijerink beim Stamm Lactococcus agglutinans, früher von Barendrecht Leuconostoc agglutinans genannt, beobachtete. Der von uns isolierte Mikroorganismus gleicht eben dieser Art von Bakterien am meisten, jedoch mit dem Unterschied, daß unter den Stoffwechselprodukten, unter aeroben Verhältnissen von uns Ameisensäure und Alkohol gefunden worden sind, im Gegensatz zu den früheren Beschreibungen.

Nach ihren morphologischen, kulturellen und biochemischen Eigenschaften stellten die von uns isolierten Mikroorganismen ein Mittelglied dar, welchen die Gruppe der Pseudo-Milchsäurebakterien mit den Leukonostoc-Arten verbindet.

Der bei der Agglutination der Backhefe isolierte Lactococcus agglutinans entwickelt sich so schnell und gerne in Symbiose mit der Hefe bei starker Lüftung, daß er die Hefe sogar zum Agglutinieren bringt, wenn die Bakterien im Anfang bloß als einzelne Individuen vorhanden waren.

Dadurch unterscheiden sie sich von einer Reihe anderer Mikroorganismen, welche nur in dem Falle befähigt sind, die Hefe zu agglutinieren, wenn letztere in eine Nährflüssigkeit eingesät wurde, wo die Bakterien sich vorläufig vermehrt hatten. Man beobachtet dies im Falle des Bact. Mesentericus und der Essigbakterien vom Typus B. Xylinum.

Weitere von uns angestellte Versuche bezweckten, das Wesen der Hefen-Agglutination in Gegenwart des Lactococcus agglutinans aufzuklären. Ist die Agglutination obligatorisch mit einer Veränderung der fermentativen Tätigkeit der Hefe verbunden infolge der Störung ihrer normalen Ernährung oder Vergiftung mit den Stoffwechselprodukten der Hefe, welche in der Nährflüssigkeit vorhanden sind? Die erste Serie unserer Versuche, welche das Studium des unmittelbaren Einflusses der agglutinierenden Bakterien auf die Hefe zum Zweck hatte, beantwortet die erste von den aufgestellten Fragen im negativen Sinne.

Die Bakterien können die Agglutination der Hefe hervorrufen, ohne den normalen Prozeß ihrer Entwicklung und ihrer Lebensfunktion zu verletzen.

Vier Erlenmeyer-Kolben wurden mit 150 ccm steriler Melasse von 3° Blg in flacher Schicht, 2 cm hoch, mit der Hefenrasse S geimpft. 48 Std. nach beendigter Hefenvermehrung, welche durch eine Zählung in der Türkschen Zählkammer kontrolliert wurde, wurden 2 Versuchskolben bei 70° C 10 Min. lang pasteurisiert und in zwei anderen blieb die Hefe im lebendigen Zustand. Darauf wurden alle 4 Kolben mit dem Lactococcus agglutinans beimpft und die Kolben im Thermostaten bei 30° C stehen gelassen. Nach 24 Std. konnte eine intensive Agglutination bei völliger Klärung der Nährflüssigkeit in allen 4 Gefäßen beobachtet werden. Der Grad der Agglutination wurde durch den Schnelligkeitsquotienten des Niederschlagens der Hefe gemessen = SF nach N. Nielsen (Annales de la brasserie et de la distillerie. 25 mars 1934. No. 6).

Tabelle 8.

Versuch Nr.	Versuchsbedingungen	Große SF		Anmerkung
		vor dem Versuch	nach dem Versuch	
1	Hefe unpasteurisiert	1,07	1,48	Kleine Flocken
2	Hefe unpasteurisiert	1,07	1,48	,, ,,
3	Hefe pasteurisiert	1,07	1,2	Große ,,
4	Hefe pasteurisiert	1,07	1,2	,, ,,

Man ersieht aus diesen Versuchen, daß die Bakterien gesunde Hefe mit normaler fermentativer Wirkung agglutinieren, dabei wird auch die Gärkraft der Hefe nicht vermindert. Das Zusammenkleben der toten Hefezellen bestätigt die Agglutinationsfähigkeit der Bakterien, unabhängig von

dem Bestand der enzymatischen Tätigkeit der Hefe. Sie wird mechanisch von den schleimigen Ausscheidungen der Bakterien überzogen und zusammengeklebt. Bei der mikroskopischen Betrachtung der gefärbten Präparate der agglutinierten Hefe kann man gewöhnlich Gruppen von Hefezellen wahrnehmen, welche von Bakterien verklebt und zusammengeballt sind (Abb. 3 u. 4). Weitere Versuche haben ergeben, daß ein direkter Zusammenhang zwischen der Schnelligkeit der Agglutination und der Menge der agglutinierenden Bakterien vorhanden ist. Das Durchmischen der sich vermehrenden Bakterien mit den Hefezellen durch einfaches Schütteln oder durch eine Durchlüftung bewirkt eine direkte Berührung der agglutinierenden Bakterien mit der Hefe.



Abb. 3. Vergrößerung 300 ×.

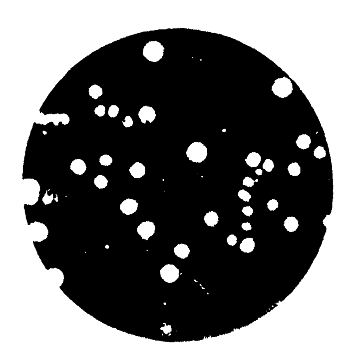


Abb. 4. ½ natürliche Größe.

Es wurden Versuche mit Zahlenbestimmung der Bakterien angestellt, dabei wurden einige Kolben, welche Hefe und Bakterien enthielten, durchgeschüttelt, andere Kolben wurden ruhig stehengelassen. Das Auftreten von Flocken wurde sowohl mikroskopisch als auch makroskopisch untersucht.

Tabelle 9a.

Versuch Nr.		Stunden								
		0	1	2	3	4	5	6	7	24
1	Hefengehalt in 1 m/m	44 536	—	—	44 860	44 250	42 400	—	54 700	32 500
	Bakterienzahl	1 500	4 900	22 600	27 200	30 700	75 200	86 600	140 000	125 800
	Bakterien u. Hefeflocken	—	—	—	—	1000	1 600	2 100	3 300	2 700
1	Sichtbare Agglutination	—	—	—	—	—	—	— +	+	+ +
2	Desgleichen	—	—	—	—	—	—	— +	+	+
3	Desgleichen	—	—	—	—	—	—	—	—	+

Versuchsbedingungen: Versuch 1: 50 ccm einer eintägigen Kultur der Rasse S (in flach ausgegossener Melassemaische) wurde mit 0,5 ccm einer bakteriellen Emulsion geimpft. Der Versuchskolben wurde öfters durchgeschüttelt. Allstündlich wurde je 1 ccm steril entnommen und in 1 ccm Methylenblau in 4proz. Formalinlösung verdünnt und darauf in der Türkschen Zählkammer abgezählt. Jede Stunde wurde der Agglutinationszustand notiert.

Versuch 2 wurde ebenso wie Versuch 1 ausgeführt, jedoch wurden die Kolben jede Stunde durchgeschüttelt.

In Versuch 3 wurden dieselben Bedingungen wie in den Versuchen 1 u. 2 innegehalten. Der Kolben stand 24 Std. lang im ruhigen Zustand.

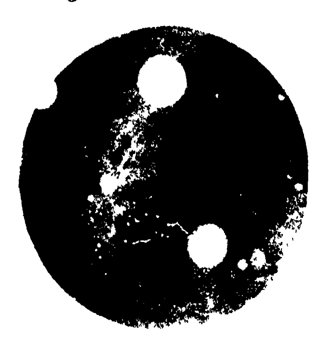


Abb. 5. ½ natürliche Größe.

Wie aus der Abb. 6 und der Tabelle 9 ersichtlich ist, beginnt die Vermehrung der Bakterien schon nach 1 Std. und man kann erst beim Verhältnis zwischen den Bakterien und der Hefe wie 1 : 1 beim Mikroskopieren das Erscheinen von Flocken wahrnehmen. Die Mehrzahl der Hefezellen behält dabei noch ihren staubigen Charakter. Nur bei einem Verhältnis der Bakterien zur Hefe von 3 : 1 wird in der 7. Stunde eine Agglutination bemerkbar. Die Schnelligkeit der Agglutination hängt beim Vorhandensein reifer Hefe im Versuchskolben nur von dem Verhältnis der Bakterienzahl zu der Hefenzahl ab und in den Versuchen, in denen die Bakterien sichtlich vorherrschen (Tab. 9 b, Versuche 1 u. 2), beginnt die Agglutination nach 15—30 Min. beim Schütteln des Versuchskolben.

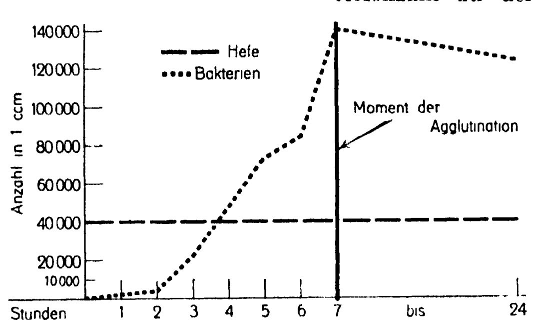


Abb. 6. Verhältnis der Hefe zu den Bakterien bei der Agglutination.

Die Fähigkeit, das Zusammenkleben der Hefezellen hervorzurufen, ist eine Eigentümlichkeit des Lactococcus agglutinans und wird weder bei Milchsäurebakterien verschiedener Arten, welche befähigt sind, sich bei 30° C und starker Lüftung zu vermehren, noch bei den Bakterien, welche zur Gruppe Leuconostoc gehören, bemerkbar.

Tabelle 9b.

Versuch Nr.	Absolute Menge der Hefe (Rasse S)	Absolute Menge d. Bakterien (Lactococcus agglutinans)	Verhältnis zwischen der Hefen- und Bakterienzahl	Sichtbare Agglutination 15 Min.	30 Min.	1 Stunden	2	3	4	5	6	7	8	24
1	270 600 000	1 830 000 000	1 : 7	—+	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++
2	90 200 000	457 500 000	1 : 5	——	+	+	+	++	++	++	++	++	++	++
3	541 200 000	457 500 000	1 : 1	—	—	—	—	—	—	—	—+	—+	—+	—+
4	541 200 000	137 250 000	4 : 1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—+

Bei Versuchen des Lactococcus agglutinans mit verschiedenen Heferassen, welche in der Spiritusfabrikation, bei der Weingärung und in der alkoholfreien Industrie gebräuchlich sind, agglutinierten alle Heferassen, die Agglutinationsstufe (SF nach Nielsen) war aber verschieden, wobei Rasse S, welche von uns bei unserer Experimentalarbeit angewandt wurde, offenbar keine Rassenneigung zur Agglutination aufweist (s. Tab. 11).

Tabelle 10. Symbiose der Rasse S mit verschiedenen Mikroorganismen.

Versuch Nr.	Versuchsbedingungen	p_H vor dem Versuch	p_H nach dem Versuch	Vorhandensein oder Abwesenheit der Agglutination
1	Als Kontrolle Reinkultur der Rasse S	6,2	6,2	
2	Rasse S + Lactococcus agglutinans	6,2	4,6	
3	Rasse S + Leuconostoc mesenterioid.	6,0	5,3	—
4	Rasse S + Milchsäurebakterien . .	6,0	4,8	—
5	Rasse S + Milchsäurebakterien Nr. 1	6,1	4,5	—

Anmerkung: Die Versuche wurden mit Melassemaische ausgeführt, welche gelüftet wurde. Die Luft wurde in schwefelsäurehaltigem Wasser gewaschen. Die angewandte Hefe bestand aus 30 ccm einer eintägigen Reinkultur + 0,5 ccm Bakterien.

Tabelle 11. Lactococcus agglutinans in Symbiose mit verschiedenen Heferassen.

Versuch Nr.	Heferasse	Agglutinationsstufe (nach d. Augenmaß)	Agglutinationsstufe nach der Methode von Nielsen bestimmt SF-Größe
1	Nr. 49	+	1,26
2	S	+	
3	XII	+	
4	XV	+ +	1,43
5	II	+ +	
6	M	+ + +	1,45
7	F	+ + +	
Kontrolle	—	— — —	1,07

Es muß jedoch in Betracht gezogen werden, daß ungeachtet der offenbaren Möglichkeit, Flockenhefe durch mechanisches Zusammenkleben durch bakterielle Zellen zu bewirken, die Möglichkeit vorhanden ist, bei sorgfältiger Verfolgung des Agglutinationsganges und seines Auswuchses in den Gärbottichen bei der Backhefefabrikation die Flockenbildung in zwei Richtungen zu beobachten: einerseits wird staubige Hefe in Flockenhefe durch die sie umgebenden kleinen Mikroorganismen umgewandelt, welche im Mikroskop bei großen Vergrößerungen und am besten als Färbepräparate sichtbar werden und andererseits bemerkt man eine Störung der normalen Sprossung der Zellen, wobei die Tochterzellen sich von den Mutterzellen nicht ablösen und anfänglich nur unter dem Mikroskop sichtbare kleine Konglomerate bilden, und erst dann kann man mit unbewaffnetem Auge geringe flockig aneinandergeklebte Hefenzellen wahrnehmen. Die ersten Versuche wurden mit Hefen angestellt, welche in Kulturflüssigkeiten wuchsen, in denen der Lactococcus agglutinans unter Lüftung in Melassemaische 24 Std. lang wachsen konnte, worauf die Flüssigkeit bei 80° C 1 Std. lang pasteurisiert wurde. Die Vermehrung der Hefe erfolgte in der kulturellen Flüssigkeit selbst, sowie in der kulturellen Flüssigkeit, welche in verschiedenen Verhältnissen mit einer Melassemaische gemischt war. Jedoch erfolgte keine Agglutinations-Erscheinung. Im Versuch 12 der Tabelle 12, wo die Hefe in der kulturellen Flüssigkeit selbst wuchs, konnte man nur eine Verzögerung der Hefevermehrung beobachten; offenbar wirkten die Stoffwechselprodukte der Bakterien auf die Hefezellen nachteilig. Aus diesem Grunde untersuchten wir den Einfluß aller bei der biochemischen Analyse der kulturellen Flüssigkeit festgestellten Stoffwechselprodukte auf die Hefezellen.

Tabelle 12.

Versuch Nr.	Versuchsbedingungen	Menge des zugefügten Reagens auf 100 ccm des Nährbodens	Vorhandensein od. Abwesenheit der Agglutination
1	Kontrolle: Reinkultur der Rasse S . .	0	—
2	Rasse S + Milchsäure	2,0	—
3	Rasse S + milchsaures Calcium . . .	2,4	—
4	Rasse S + Essigsäure	0,1	—
5	Rasse S + essigsaures Calcium . . .	0,134	—
6	Rasse S + Alkohol	0,12	—
7	Rasse S + Acetaldehyd	0,12	—
8	Rasse S + Ameisensäure	0,0135	+
9	Rasse S + ameisensaures Natrium . .	0,0225	+
10	Rasse S + ameisensaures Natrium . .	0,011	—
11	Rasse S + ameisensaures Natrium . .	0,00225	—
12	Rasse S + kulturelle Flüssigkeit bei 70° C pasteurisiert	—	—

Diese Substanzen wurden in die Melassemaische gleichzeitig mit der Anstellhefe in denjenigen Mengen eingetragen, welche in den Versuchskolben bei der aeroben Vermehrung der Bakterien beobachtet waren (s. Tab. 12). Von allen angewandten Reagenzien ruft nur die Ameisensäure in einer Menge von 0,0135 g auf 100 ccm Nährflüssigkeit zugefügt, eine Agglutination hervor und die agglutinierende Hefe besaß eine dunklere Farbe und eine verminderte Gärkraft (Tab. 13).

Tabelle 13. Triebkraft der Hefe.

Musterbezeichnung	Triebkraft
Hefe 9: Tabelle 12	84 Min.
Hefe 10: Tabelle 12	76 ,,
Hefe 1: Kontrolle	67 ,,

Anmerkung: Die Triebkraftbestimmung erfolgte nach der Standardmethode des deutschen Hefesyndikats.

Hefe, welche in Gegenwart von 0,011 g und 0,00225 g ameisensaures Natrium gezüchtet wurde, zeigte nach 24 Std. keine Agglutination, dunkelte aber nach; nach 48 und 72 Std. konnte man jedoch das Aufkommen kleiner Flocken in derselben Nährflüssigkeit beobachten und eine bedeutende Farbveränderung der Hefe. Selbst kleine Mengen Ameisensäure und deren Salze verursachen offenbar eine Störung der Lebenstätigkeit der Hefe. Sie verliert ihre normale Gärkraft und bildet wahrscheinlich diejenigen proteolytischen Fermente nicht, von welchen die Anhänger der enzymatischen Theorie sprechen. Die Hefemembran verschleimt dabei.

Weiterhin wurde durch eine Anzahl Versuche festgestellt, daß der p_H der Umgebung beim Lüftungsverfahren keinen Einfluß auf die Agglutination ausübt.

Wie aus der Tabelle 14 zu ersehen ist, erfolgt beim Einimpfen einer Reinkultur der Rasse S selbst bei einem $p_H = 2,8$ keine Agglutination, während in den Parallelgefäßen, welche mit Lactococcus agglutinans geimpft sind, überall eine Agglutination auftritt.

Das Vorhandensein von Alkohol in den Gärgefäßen unterdrückt den

Lactococcus agglutinans, jedoch erst bei einem Gehalt von 3% Alkohol und mehr (s. Tab. 15).

Tabelle 14.

Versuchsgefäße	Vorhandensein oder Abwesenheit einer Agglutination		
	PH = 4,4	PH = 3,8	PH = 2,8
Reinkultur der Rasse S	—	—	—
Rasse S + Lactococcus agglutinans. . .	+	+	+

Anmerkung: Der Versuch wurde in Melassewurze nach dem Luftungsverfahren ausgeführt. Die Erniedrigung des Wasserstoffionenexponenten wurde durch Zugabe von Milchsäure bewirkt. Die Versuchsdauer betrug 24 Stunden.

Tabelle 15.

Nummer des Reagenzgläschens	Menge Alkohol in %	Wachstumsstufe nach 24 Stunden
1	1	+ +
2	2	+ +
3	3	+
4	4	+ —
5	5	+ —
6	6	+ —
7	7	+ —
8	8	— —

Anmerkung: Die Versuche wurden in einer 6° Blg-Würze ausgeführt.

Schlußfolgerungen.

1. Die bei der Backhefe-Fabrikation auftretende Agglutination der Hefe wird durch Mikroorganismen vom Typus Lactococcus agglutinans hervorgerufen, welche befähigt sind, unter Lüftungsbedingungen Ameisensäure und Essigsäure zu bilden.

2. In Symbiose der Bakterien Lactococcus agglutinans mit der Hefe unter Lüftungsbedingungen erfolgt die Agglutination der Hefe auf Kosten der unmittelbaren Verklebung der Hefezellen durch die sich rasch vermehrenden Mikroorganismen. Außerdem erfolgt eine Störung des normalen Stoffwechsels der wachsenden Hefe infolge der sich in der Nährflüssigkeit ansammelnden, durch die Lebenstätigkeit der Bakterien gebildeten Ameisensäure und deren Salze. Dabei wird die Hefenmembran von Schleimstoffen umhüllt, wodurch sie sich miteinander verkleben und kleine Flocken bilden.

3. Eine durch Mikroorganismen mechanisch verklebte flockige Hefe besitzt eine normale Gärkraft. Eine Agglutination der Hefe, welche durch das Vorhandensein von Ameisensäure und ameisensauren Salzen in der Gärflüssigkeit bedingt ist, ist mit einer Störung der normalen Lebenstätigkeit der Hefenzellen verknüpft. Aus diesem Grunde läßt sich eine solche Hefe durch eine verminderte Gärfähigkeit charakterisieren.

4. Bei der Backhefe-Fabrikation sind gewöhnlich beide Faktoren tätig, wobei der Einfluß der Stoffwechselprodukte in Form von freier Ameisensäure und deren Salzen um so größer ist, je größer die Menge derselben und je länger ihre Einwirkungsdauer ist.

Referate.

Mikrobiologie des Düngers, Bodens, Wassers und Abwassers.

Rokitskaja, A., Mikrobiologische und fermentative Methoden zur Strohbearbeitung. [Mikrobiologičeskije i fermentatiwnije metody obrabotki ssolomy.] (Probleme und Tierzucht. Bd. 6. 1933. S. 31–35.) [Russisch.]

Die Verf.n stellte Versuche mit Stroh an, dem sie verschiedene Mikroorganismenarten (zelluloseзerstörende, nitrifizierende, denitrifizierende Bakterien, Saccharomyces cerevisiae u. a. Arten) zufügte. Die Versuche bezweckten, die besten biologischen Verfahren zur Trennung der Zellulose von inkrustierenden Stoffen des Strohes herauszufinden. Sie benutzte bei den Versuchen Winterroggenstroh, das bekanntlich sehr reich an Zellulose ist. Eine intensive Wirkung zeigten nitrifizierende und denitrifizierende Bakterien, während Sclerotinium verhältnismäßig schwach wirkte; Sacchr. cerevisiae hat sich auch als ziemlich intensiv erwiesen. Die besten Ergebnisse wurden aber mit aus den festen Exkrementen der Wiederkäuer (Büffel, Ziege, Kuh u. a.) gewonnenen Fermenten erreicht.

M. Gordienko (Berlin).

Richards, E. H., and Shrikhande, J. G., The preferential utilisation of different forms of inorganic nitrogen in the decomposition of plant materials. (Soil Science. Vol. 39. 1935. p. 1—8.)

Verff. ließen Weizenstroh verrotten unter Zugabe von NH_4NO_3 bzw. $(NH_4)_2CO_3$ bzw. $NaNO_3$ bzw. verschiedener Kombinationen dieser Salze. Sie wollten feststellen, welche N-Quelle, NH_4 oder NO_3, von den die Verrottung besorgenden Mikroorganismen am besten ausgenutzt werde. Es zeigte sich, daß zunächst das Ammoniak bevorzugt wurde, nach 14 Tagen aber kein Unterschied mehr zu erkennen war. In Gegenwart von NO_3-N traten stets größere N-Verluste auf als in Gegenwart von NH_4-N. So betrugen diese bei Zusatz von Ammonkarbonat am Schluß des Versuchs (56 Tage) etwa 15%, bei Zugabe von Ammoniumnitrat 30% und in Gegenwart von Natriumnitrat 44%. Es unterlag keinem Zweifel, daß der Nitrat-N zu einem erheblichen Teil denitrifizierenden Bakterien anheim fiel. Er ist deswegen für die Bereitung von Strohkompost bekanntlich völlig ungeeignet.

Engel (Berlin).

Fraps, G. S. und Sterges, A. J., Effect of sunlight on the nitrification of ammonium salts in soils. (Soil Science. Vol. 39. 1935. p. 85—94.)

Die Arbeit richtet sich gegen Untersuchungen von Dhar (Soil Science. Vol. 31. 1931. p. 379; Vol. 35. 1933. p. 281), wonach das Sonnenlicht maßgeblichen Einfluß auf den Nitrifikationsvorgang im Boden haben soll. Verff. besorgten sich 6 verschiedene Bodenproben von weit auseinanderliegenden Gegenden Texas'. Ein Teil des Bodens blieb ohne jede Behandlung, ein Teil wurde zur Erhöhung des Nitrifikationsvermögens mit nitrifizierenden Bakterien geimpft, ein Teil wurde sterilisiert und eine vierte Portion wurde gleichfalls sterilisiert, aber sodann geimpft. Zu jeder dieser Bodenproben wurden verschiedene NH_4-Salze [ohne Zusatz, $(NH_4)_2SO_4$, NH_4Cl und $(NH_4)_2HPO_4$] gegeben. Schließlich wurde in jedem Falle ein Teil des Bodens dem direkten Sonnenlicht ausgesetzt, ein anderer Teil blieb im Dunkeln. In keinem Falle ließ sich eine Photonitrifikation nachweisen.

Im Gegenteil, die aus dem zugesetzten NH_4-N gebildete Nitrat-N-Menge war im großen Durchschnitt im Dunkeln mit 41% ganz erheblich größer als im Licht, wo sie nur 5% betrug. Das Sonnenlicht schädigte die Salpeterbakterien offensichtlich. Im sterilen Boden, wo noch am ehesten eine photochemische Nitrifikation nachweisbar gewesen wäre, konnte überhaupt keine Zunahme des Nitrat-N während der 4wöchigen Versuchsdauer beobachtet werden. Die schädliche Wirkung des Lichtes auf die Erreger der Nitrifikation hat aber keine erhebliche Bedeutung, da die Strahlen nur unmittelbar an der Oberfläche des Bodens wirksam sind. Nach Ansicht der Verff. ist zwar die Möglichkeit einer Photonitrifikation durchaus nicht in Abrede gestellt, ihre praktische Bedeutung aber nur gering. Engel (Berlin).

Berg, W. und **Scheloumowa, A.**, Mikrobiologische Charakteristik des Sandes von Repetek. [Mikrobiologičeskaja charakteristika peskow Repeteka.] (Die Nachrichten d. Akademie d. Wissenschaften. Bd. 5. 1931. S. 673—683.) [Russisch.]

Sand von Repetek stellt einen typischen Wüstensand mit hohem Gehalt an Ca und minimalem an N dar. Bei Untersuchungen seiner Bakterienflora wurde festgestellt, daß im oberen (0—20 cm), durch die Sonne stark gewärmten Horizont nur ganz geringe Bakterienmengen vorkommen, doch wächst ihre Zahl mit der Tiefe bedeutend (in einer Tiefe von 25—50 cm betrug sie schon ca. 1700 Stück, in einer solchen von 90 cm = 26 600 Stück usw.). Die Zusammensetzung der Mikroflora des Sandes ist sehr eintönig. Es fehlen in ihm gänzlich nitrifikations- sowie stickstoffbindende Bakterien, und man konnte nur ammonifizierende Mikroorganismen (Aktinomyceten usw.) feststellen. M. Gordienko (Berlin).

Malčewskaja, N., Zur mikrobiologischen Charakteristik einiger Waldbodentypen. [K mikrobiologičeskoj charakteristike nekotorych tipow lessnych počw.] (Počwowedenije. Bd. 3. 1933. S. 225.) [Russisch.]

Die vom Verf. angestellten Versuche umfassen folgende Prozesse: Nitrifikation, Ammonifikation, Denitrifikation, aerobe Zellulosezersetzung, aerobe und anaerobe Stickstoffbindung und die Geschwindigkeit der Zersetzung der organischen Bodensubstanz. Zur quantitativen Bestimmung der Mikroben wurde eine Aufzählung der Mikroben mit Zuhilfenahme der direkten mikroskopischen Methode, den einzelnen Horizonten nach, vorgenommen. Die erhaltenen Resultate erlauben den Schluß zu ziehen, daß es ziemlich schwer ist, den bestimmten Bodentypen oder ihren einzelnen Horizonten spezielle mikrobiologische Eigenschaften beizumessen. Die geringsten Schwankungen klimatischer, physikalischer usw. Faktoren verändern die Bodeneigenschaften und somit auch die Entfaltung der die biochemischen Bodenprozesse bestimmenden Lebensbedingungen der diesen Boden belebenden Mikroflora. M. Gordienko (Berlin).

Kasanskij, A., Zur Mikroflora der Insel „Nowaja Zemlja". [K mikroflore Nowoj Zemli.] (Die Arbeiten d. Polarkommission. 7. Folge. 1932. S. 79—109.) [Russisch.]

Die vom Verf. auf Nowaja Zemlja untersuchten Böden lagern am südöstlichen Rande der Insel unter dem 73° 16′ nördl. Breite. Verf. unterscheidet

dort folgende Bodentypen: 1. Bergtundraböden, die eine 10—20 cm starke Humusschicht aufweisen; 2. steinige Tundraböden; 3. sumpfige Tundraböden; 4. Moostundraböden, die total mit Moos und Flechten bedeckt sind usw. Die untersuchten Bodenarten zeichnen sich durch eine ziemlich reiche und mannigfaltige Mikroflora aus, wobei man in diesen Böden u. a. auch Nitrifikations- und Denitrifikationsbakterien, aerobe und anaerobe Zellulosezersetzer, Fäulnis- und Knöllchenbakterien fand. Azotobakter fehlt aber in den dortigen Böden gänzlich. Die Zahl der Bakterien betrug: in steinigem Tundraboden = 896 Mill., in Moostundraboden = 756 Mill., in sumpfigem Tundraboden = 309 Mill. je 1 g Boden.

M. Gordienko (Berlin).

Ssuschkina, N., Zum Studium der Mikroflora der Böden im Delta des Flusses Lena. [K izučeniju mikroflory počw delty r. Leny.] (Arbeiten des Dokutschaew-Instituts f. Bodenkunde. 6. Folge. 1932. S. 191—197.) [Russisch.]

Der untersuchte Boden stellt einen torf-gleiigen Moorbodentyp dar, der stark mit Moos und Carex-Arten bedeckt ist. Die Zusammensetzung seiner Mikroflora ist sehr eintönig, Azotobakter, sowie nitrifizierende und zellulosezerstörende Bakterien fehlen in ihm gänzlich. Das ganze mikrobiologische Leben findet nur in 2—5 cm starkem A-Horizont statt, unter welchem nur Fäulnis- und einige denitrifizierende Bakterienarten vorkommen. Die Spaltung der Eiweißstoffe geschieht unter der Beteiligung der Fäulnis- und anaeroben Bakterien. Nitrate werden im A-Horizont bis zu N, in der darunterliegenden Schicht zu Nitriten reduziert. Auch die Buttersäurebakterien kommen nur in einer Tiefe von 2—5 cm vor.

M. Gordienko (Berlin).

Beger, H., Biologische Reinigung in dünner Abwasserschicht. Untersuchungen an Versuchseinrichtungen neuer und alter Aufbauart. (Beihefte zum Gesundheitsingenieur. Reihe II. Heft 15. 1935. 19 S.)

Verf. stellte vergleichende Untersuchungen über die Organismenzusammensetzung an verschiedenen biologischen Klärkörpern an.

Der Tellerkörper wies in seinem oberen Teile eine mehr polysaprobe, im unteren Teile eine mehr mesosaprobe Schlammbeschaffenheit auf. Schwefelbakterien traten im allgemeinen gegenüber Pilzen, anderen Bakterienformen und Amoeben zurück. Besiedlung und damit Beschaffenheit des Schlammes zeigten in den verschiedenen Versuchsreihen Abweichungen, ohne daß jedoch ein deutlicher Einfluß von Temperaturunterschieden erkennbar war. Sphaerotilus natans und Paramaecium waren für den Reinigungsprozeß wenig bedeutungsvoll.

Der Reichle-Körper erwies sich als günstigeres Beobachtungsobjekt als der Tellerkörper. Bei dem zweistufig betriebenen Körper wies der Schlamm am Endablauf bei Anwendung eines in seiner Konzentration (50—400 mg $KMnO_4$) recht starken Schwankungen unterworfenen Abwassers bei einer Belastung von 1 cbm auf 0,77 cbm Material eine mehr oder weniger mesosaprobe Lebewelt auf. Der Ablauf war fäulnisfrei, nitrit- und nitratführend und besaß einen aktivierten aeroben Schlamm normaler Beschaffenheit. Im oberen Körperabschnitt gelangte eine im Querschnitt dreifache Schichtung (Beggiatoaschicht, Faulschlammschicht und Bodenbelag) aufweisende polysaprobe Beggiatoazone zur Entwicklung. Bemerkenswert sind die im Faulschlamm massenhaft beobachteten „grünen Bak-

terien". Bei Überbelastung des Klärkörpers kann der normalen Beggiatoazone eine noch ausgeprägtere polysaprobe Phase (Initialphase) vorausgehen, in der das biologische Leben vorwiegend, wie z. B. in einem Schlammfaulraum, auf die Anwesenheit anaerober Fäulnisbakterien beschränkt ist und durch die Reduktionsvorgänge amorpher Schwefel entstehen kann. Im unteren Körperabschnitt wurde mit zunehmender Mesosaprobie durch das Schwinden der Beggiatoaschicht eine nur zweifache Schichtung beobachtet, die in den untersten Schalen aus einem fast schwebend aufliegenden Schlamm und einer vorwiegend aus Ziliaten bestehenden Bodenschicht bestand. Der Endschlamm entspricht dem in Belebtschlammanlagen vorkommenden „aktivierten" Schlamm. Der Einfluß der Belichtung zeigte sich im stärkeren Auftreten von Grünalgen.

Für den mit angefaultem Abwasser beschickten einstufig betriebenen Reichle-Körper werden auf Grund der stichprobenhaften Untersuchungen ähnliche Resultate vermutet wie bei dem zweistufig betriebenen Klärkörper.

Auf Grund der bei den Untersuchungen am Reichle-Körper erhaltenen Ergebnisse stellt Verf. einen Vergleich an mit anderen biologischen Reinigungsanlagen wie Tropfkörper, Belebtschlammverfahren und Tauchkörper, wobei sich, wenigstens andeutungsweise, das Vorkommen der polysaproben und mesosaproben Stufe nachweisen ließ.

Abschließend wird der Reichle-Körper sowohl als praktisch wichtig wie auch als geeignet für weitere Untersuchungen über den biologischen Reinigungsprozeß bezeichnet. B u c k s t e e g (Berlin-Dahlem).

Schädigungen der Pflanzen durch Pilze, Bakterien und filtrierbare Vira.

Ryker, T. C., F u s a r i u m y e l l o w s o f c e l e r y. (Phytop. Vol. 25. 1935. p. 578—600, 7 figs.)

Verf. konnte ebenso wie andere Forscher feststellen, daß die Symptome der durch Fusarium hervorgerufenen „Gelbkrankheit" des Selleries sehr verschieden sein können. Verf. konnte im Gewächshaus 2 verschiedene Typen von Chlorose unterscheiden. Isolationen von 2 verschiedenen Orten in Wisconsin stimmten mit einer Herkunft aus Michigan in bezug auf Pathogenität überein. Sie unterschieden sich aber im Grad der Virulenz und im Verhalten auf Nährböden. Auf Kartoffel-Traubenzucker-Agar waren die extremen Temperaturen für das Wachstum 8 und 36° C; das Wachstum war gut bei 20—32° C, das Optimum lag bei etwa 28° C. Die Selleriepflanze wächst gut bei Bodentemperaturen von 18—28° C. Bei der anfälligen Sorte Golden Self-Blanching entwickelte sich die Krankheit bei 18—32° C. Die Inkubationszeit wurde proportional mit dem Ansteigen der Temperatur auf 28° C abgekürzt. Die Sorte Michigan G. S. B. war im höchsten Maße resistent nur bei 18° C, Winter Queen und Curly Leaf Easy-Bleaching bei 26° C, während Michigan Golden bei allen untersuchten Temperaturen sich als resistent erwies. Alle Sorten, ob erkrankt oder nicht, zeigten den Erreger in der Korkschicht der Sekundärwurzel. Aber die Krankheitssymptome wurden nur dann beobachtet, wenn der Erreger in den Gefäßen der Primärwurzeln festgestellt wurde. Bei niedriger Bodenfeuchtigkeit, bei der die Selleriepflanze in der Entwicklung gehemmt wird, wurde auch die Krankheit zurückgehalten. W i n k e l m a n n (Berlin-Dahlem).

Butler, K. D., T h e c o t t o n r o o t r o t f u n g u s, P h y m a t o t r i c h u m o m n i v o r u m, p a r a s i t i c o n t h e w a t e r m e l o n, C i t r u l l u s v u l g a r i s. (Phytop. Vol. 25. 1935. p. 559—577, 4 figs.)

Taubenhaus hatte früher berichtet, daß die Wassermelone gegen Phymatotrichum omnivorum vollkommen resistent sei. Neuerdings konnte der Pilz jedoch von den Wurzeln abgestorbener Wassermelonen-Pflanzen isoliert werden. Bei Infektionsversuchen waren die 4 verwendeten Sorten anfällig. Zytologische Untersuchungen über das Eindringen von P. omnivorum in die Wurzeln der Wassermelonen ergaben folgendes: die Hyphen schieben sich zunächst kugelförmig zwischen die Zellen der Wirtspflanzen. In die Zelle dringt der Pilz ein, indem die Zellwand an der Berührungsstelle aufgelöst wird. Das Myzel wächst intra- oder interzellular. Die einzelnen Zellen sind sehr verschieden in bezug auf Größe und Form. Vielfach sind sie vielkernig. Die Kerne der befallenen Zellen sind kleiner als die der nicht befallenen. Phymatotrichum omnivorum wurde durch Trichoderma lignorum abgetötet.

Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Slikke, C. M. van der, Verslag van Rijkstuinbouwproefvelden over grondontsmetting tegen de Rhizoctonia-ziekte en de schurft op aardappel. [Bericht der Reichsversuchsstation für Gartenbau über Bodendesinfizierung gegen Rhizoctonia und Schorf auf Kartoffeln.] (Tijdschr. Plantenz. Heft 3. 1935. S. 65—73.)

Rhizoctonia. Versuche ergaben, daß Behandlung der Pflanzlöcher mit ¼ l 0,05proz. Sublimatlösung anfangs die Laubentwicklung der Pflanzen hemmt, wodurch beim frühzeitigen Roden die Ernte etwas herabgesetzt wird. Wird später gerodet, so nimmt die mittlere Größe der Kartoffeln und damit die Ernte erheblich zu.

Schorf. Die Versuche auf einer von Schorf stark heimgesuchten Parzelle ergaben, daß die Behandlung der Pflanzlöcher mit ¼ l 0,1proz. Sublimatlösung die besten Resultate erzielte. Für die größeren Kartoffeln wurde eine Erntesteigerung von 20% erzielt. Es zeigte sich, daß neben Schorf gleichzeitig Rhizoctonia und „Ringvuur“ bekämpft werden konnte. Eine Fortsetzung dieser Versuche wäre wünschenswert.

van Beyma thoe Kingma (Baarn).

Dixon, L. F., McLean, R. A., and Wolf, F. A., The initiation of downy mildew of tobacco in North Carolina in 1934. (Phytop. Vol. 25. 1935. p. 628—639, 3 figs.)

Durch die Untersuchungen der Verff. sollte festgestellt werden, welches die Infektionsquelle für die Primärinfektionen mit falschem Mehltau des Tabaks ist. Der Erreger überwintert in Carolina im Oosporenstadium. Anhaltspunkte dafür, daß er an Pflanzen, die durch die Kälte nicht abgetötet wurden, überwintert oder durch Samen übertragen wird, ließen sich nicht ermitteln. Es konnte beobachtet werden, daß sich Infektionen früher zeigen, wenn die Saatbeete an derselben Stelle wie im vorhergehenden Jahr als wenn sie an einer neuen Stelle angelegt wurden. Dort setzte die Sporenbildung 7—19 Tage früher ein. Verff. sehen daher die im vorhergehenden Jahr befallenen Saatbeete, die neu besät wurden, als Infektionsquellen für die Primärinfektion an. Eine wesentliche Maßnahme zur Vermeidung der Weiterverbreitung des Mehltaus des Tabaks wird deshalb darin liegen, daß die Stellen, die im vorhergehenden Jahr als Saatbeete dienten, nicht wieder als Saatbeete verwendet werden. Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Clayton, E. E. und **Stevenson, J. A.**, Nomenclature of the tobacco downy mildew fungus. (Phytop. Vol. 25. 1935. p. 516—521, 3 figs.)

Die ursprüngliche Bezeichnung Peronospora hyoscyami de Bary für den Erreger des falschen Mehltaus an Tabak bezeichnet Verf. als nicht korrekt, da der Pilz nicht in der Lage ist, Hyoscyamus niger zu infizieren. Verf. ist, da der vorliegende Pilz in allen Einzelheiten mit der Beschreibung von Adam für P. tabacina übereinstimmt, der Ansicht, daß sich die Wahl dieser Bezeichnung für den Erreger des falschen Mehltaus an Tabak empfiehlt. Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Bruyn, Helena L. G. de, De invloed van bemesting op de aantasting door Peronospora parasitica bij kool. [Der Einfluß der Düngung auf den Befall durch Peronospora parasitica bei Kohl.] (Tijdschr. Plantenz. Heft 3. 1935. S. 57—62, mit 2 Abb.)

Zur Durchführung dieser Versuche wurde von Reinkulturen ausgegangen. Da der Pilz sich auf künstlichen Nährböden nicht züchten läßt, wurden in Glasröhren sterilisierte Kohlkeimlinge je mit einer Konidie geimpft, am besten an den Keimblättern, und dieses Material zu den Infektionsversuchen verwendet. Dazu wurden junge Keimlinge auf Agarböden mit verschiedenen Nährlösungen gezüchtet und nach der Infektion unter variierenden Bedingungen gehalten. Ebenso wurden steril entnommene Stücke verschiedener Kohlarten dem Angriff des Pilzes ausgesetzt. Es zeigte sich, daß weniger der Nährboden als die Lichtmenge einen Einfluß auf den Befall ausübt. Welche Rolle das Licht dabei genau spielt, konnte noch nicht ermittelt werden. Wohl zeigte sich ein gesteigerter Befall der im Frühjahr und Herbst ergrünten Keimblätter, sowie etiolierter Blätter oder Blattstiele (letztere nach Verwundung oder Entfernung der Wachsschicht) gegenüber der im Winter ergrünten. Verf.n nimmt daher an, daß in den Zellen ein bestimmtes Gleichgewicht der den Inhalt zusammenstellenden Bestandteile herrschen müsse, um das Wachstum des Pilzes zu fördern, wobei auch der Zustand des Chlorophylls einen Einfluß ausübe. Obwohl diesen Faktoren gegenüber der Einfluß der Düngung sehr zurücktritt, konnte immerhin festgestellt werden, daß mit Kali gedüngte Kohlpflanzen weniger absterbende Blätter aufzuweisen hatten als diejenigen ohne Kali.

van Beyma thoe Kingma (Baarn).

Pady, S. M., Aeciospore infection in Gymnoconia interstitialis by penetration of the cuticle. (Phytop. Vol. 25. 1935. p. 453—474, 5 figs., 2 plates.)

Die Untersuchungen zeigten, daß die Infektion von Gymnoconia interstitialis mit Hilfe von Appresorien erfolgt, die am Ende der Keimschläuche gebildet werden. Der gesamte Inhalt der Äzidiospore tritt ein und die beiden Kerne teilen sich dann, so daß das reife Appressorium vierkernig ist. Das Myzel breitet sich rasch aus und nach 5 Tagen sind Haustorien gebildet. Teliosporen wurden vom 21. Tage nach dem Eindringen an beobachtet. Das Eindringen erfolgt sowohl durch die Ober- wie auch durch die Unterseite der Blätter bei der schwarzen Johannisbeere, der schwarzen Himbeere und der Brombeere.

Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Westerdijk, Joh., Kort verslag van de onderzoekingen over de iepenziekte, verricht in het Laboratorium „Willie Commelin Scholten" gedurende 1934. [Kurzer Bericht über die Untersuchungen über die Ulmenkrankheit im Jahre 1934 im Lab. „W. C. S." ausgeführt.] (Tijdschr. Plantenz. Heft 5. 1934. S. 100—103.)

Die Anzahl der in den verschiedenen holländischen Baumschulen ausgeführten Infektionsversuche mit Graphium ulmi belief sich auf 2650. Es zeigte sich von neuem, daß einige, schon früher herausgesuchte Ulmenarten und Varietäten: U. pumila und U. pumila pinnatoramosa für die Krankheit wenig anfällig sind. Von den numerierten Sämlingen dieser resistenteren Arten erwies sich Nr. 24 als die bessere, weshalb diese einer Reihe von Baumzüchtern zwecks weiterer Prüfung übergeben wurde. van Beyma thoe Kingma (Baarn).

Buisman, Christine, Verslag over de onderzoekingen betreffende de iepenziekte verricht in het Phytop. Lab. „Willie Commelin Scholten" te Baarn gedurende 1934. [Bericht über die im Phytop. Lab. „W.C.S." zu Baarn ausgeführten Untersuchungen über die Ulmenkrankheit im Jahre 1934.] (Tijdschr. Plantenz. Heft 5. 1935. S. 104—119, mit 7 Abb.)

Allgemein kann gesagt werden, daß im Jahre 1934 die Ulmenkrankheit etwas weniger verheerend aufgetreten ist als im Jahre 1933. Von der Staatlichen Forstverwaltung wurden 30 000 Ulmen gefällt gegen 70 000 in 1933. Die Krankheit wurde in Spanien noch nicht mit Sicherheit festgestellt, dagegen wohl in Portugal, in der Tschechoslowakei, in Ungarn, Jugoslavien und Italien. In den Vereinigten Staaten breitete die Krankheit sich stark aus.

Die Infektionsversuche wurden fortgesetzt. Die Resultate sind in Tabellen zusammengestellt. Das Hauptgewicht wurde auch diesmal gelegt auf die Infektionsversuche mit Sämlingen der im vorigen Jahre ausgewählten resistenteren Arten. Von diesen numerierten Sämlingen entsprach Nr. 24 völlig den Erwartungen und wurde deshalb mehreren Züchtern zur weiteren Prüfung übergeben. van Beyma thoe Kingma (Baarn).

Bakker, E. M. van Zinderen, Investigations about the Morphology and Physiology of Physalospora cydoniae Arnaud. [Untersuchungen über die Morphologie und Physiologie von Physalospora cydoniae Arnaud.] Dissertation. Taconis (Leiden, Holl.) 1935. 110 S., mit 8 Taf.

Verf. untersuchte einen Stamm von Physalospora cydoniae, in den Vereinigten Staaten gesammelt und isoliert von Ulmus americana. Dieser Pilz, der sowohl Askosporen wie Pyknosporen erzeugt, verursacht auf Apfel und anderen Fruchtbäumen sowohl Blattflecke wie Fruchtfäule (Black rot) und Krebs.

Die Nomenklatur ist ziemlich verwickelt und hat schon manchmal zu Konfusionen Anlaß gegeben, da zwei sich nahestehende Pilze miteinander verwechselt wurden, nämlich Sphaeria malorum Berk. (Syn. Diplodia mutila Fr.) und Sphaeropsis malorum Peck (Syn. Physalospora obtusa [Schw.] Cooke). Die Untersuchung von Rein-

kulturen des Pilzes sowie eine genaue Durchsicht der betreffenden Literatur führte zu dem Schluß, daß der Pilz identisch sei mit dem zweiten der oben genannten Organismen und den Namen Physalospora cydoniae Arnaud führen müsse.

Aus Kulturversuchen in Richards Nährlösung ging hervor, daß das Wachstumsoptimum, ermittelt durch Vergleichung der Trockengewichte, nach 28 Tagen erreicht wird. Als C-Quelle erwies sich lösliche Stärke am günstigsten, weniger gut eigneten sich Dextrin, Maltose, Saccharose, Galaktose, Gummi arabicum, Laktose und Pepton. Die beste N-Quelle ist Pepton, Nitrate wirken weniger gut, aber jedenfalls noch besser wie Ammoniak-Verbindungen. Asparagin wirkt günstig, Harnstoff dagegen nicht. Optimale Konzentrationen für Saccharose sind 27%, für Kaliumphosphat 0,27%, für Mg 0,25% $MgSO_4 \cdot 7$ aq. Pigmentbildung trat nur auf in Nährlösungen mit einem p_H zwischen 4,5 und 7,5, am stärksten in Lösungen mit 3—30% Saccharose und weniger als 20 g KNO_3 pro Liter.

Die Chlamydosporen wurden einzellig befunden, sie traten am meisten auf, nachdem der Pilz schon einige Zeit gewachsen war. Pykniden traten anfangs auf in Lösungen mit einem p_H von 4—7,0, später wurden keine mehr gebildet. Abwesenheit von S setzte die Neigung zum Fruktifizieren herab, Mg-Mangel hemmte sie vollständig.

Verf. kommt zu dem Schluß, daß Physalospora cydoniae ein Pilz sei, der hohe Konzentrationen liebe, was sich dadurch erkläre, daß derselbe besonders das Parenchym von Früchten, Blättern und Zweigen angreife, wo der Saft konzentrierter ist als in den Holzgefäßen.

van Beyma thoe Kingma (Baarn).

Goidanich, G., Coloration du bois de pin produite par une variété de Sphaeropsis Ellisii Sacc. (Soc. Intern. di Microbiol. Boll. della Sez. Ital. Vol. 7. 1935. p. 181—184.)

Verf. hat es sich zur Aufgabe gemacht, die für die italienischen Verhältnisse wichtigen durch pilzliche Erreger verursachten Verfärbungen verschiedener Hölzer zu untersuchen. In der vorliegenden Mitteilung berichtet er über die Biologie eines Pilzes, den er als eine Varietät von Sphaeropsis Ellisii ansieht, und der Pinienholz dunkelgrün bis schwarz verfärbt. Er befällt nicht nur totes, lagerndes Holz, sondern auch lebende Bäume, in die er durch Fraßstellen von Myelophilus piniperda gelangt.

Bortels (Berlin-Dahlem).

Riker, A. J., Ivanoff, S. S., and Kilmer, F. B., Antiseptic solutions and antiseptic adhesive tape in relation to control of hairy root, crown gall and other overgrowths on nursery apple trees. (Phytopath. Vol. 25. 1935. p. 192—207.)

Die Untersuchungen zur Bekämpfung von Haarwurzelbildung, Wurzelkropf und anderen Wucherungen an aufgepfropften Apfelbäumen wurden fortgeführt, wobei zur künstlichen Infektion der Baumschulpflanzen Phytomonas rhizogenes diente. Durch kurzes Eintauchen in eine Lösung von Quecksilberchlorid 1 : 1000 oder Kadmiumchlorid 1 : 100 konnten die Wurzeln von Apfelsämlingen ohne sichtbare Schädigung desinfiziert werden. Ferner wurden Apfelsämlinge und aufgepfropfte Apfelbäume durch Umwickeln mit einem antiseptischen Pflaster, auf dessen Klebschicht Sublimat im Gewichtsverhältnis von 1 : 300 verteilt war, wirksam gegen die Bakterien geschützt. Bei großer Infektionsgefahr für die Apfelsämlinge zur

Pfropfzeit wird empfohlen, die gereinigte Sämlingswurzel eine Woche vor dem Pfropfen in eine Sublimatlösung 1 : 1000 eine Minute lang zu tauchen und nach dem Pfropfen die Pfropfstelle mit dem antiseptischen Pflaster zu umwickeln. Praktische Erfahrungen liegen hiermit noch nicht vor.

H. Müller (Berlin-Dahlem).

Tierische Schädlinge.

Meyer-Hermann, K., 75 Millionen Maikäfer! (Dtsch. Landwirtsch. Presse. Bd. 61. 1934. S. 616.)

Verf. berichtet über seine im Jahre 1934 angestellten Beobachtungen zur Maikäferbekämpfung. Außer dem Schutz der natürlichen Feinde, wie Krähe, Star, Maulwurf, empfiehlt er zur Vernichtung der Engerlinge, wo es angängig ist, ein Walzen von Wiesen und Weiden mit einer 80—100 Ztr. schweren Walze. Das Absammeln der Maikäfer hat sich gut bewährt. Die Fangergebnisse waren trotz der niedrigen Fangprämie von 4 Rpfg. je Liter über Erwarten gut. Eingetragen wurden auf Grund der amtlichen Grundlagen in Kurhessen 166 376 l, das sind etwa 75 Millionen Maikäfer.

Goffart (Kiel-Kitzeberg).

Filipjev, I. N., Die in der Landwirtschaft nützlichen und schädlichen Nematoden. (Schr. d. Akad. d. landw. Wissenschaften Moskau. 1934. 440 S., m. 333 Abb.) Preis: 7 Rub.

Das in russischer Sprache abgefaßte Buch gibt in 5 Kapiteln eine Übersicht von dem heutigen Stand unserer Kenntnisse über eine Tiergruppe, die in den letzten Jahrzehnten eine steigende Bedeutung erlangt hat. Nach einer Einführung in die systematische Stellung der Nematoden wird zunächst eine genaue Beschreibung des äußeren und inneren Baues sowie eine Darstellung der Lebensweise, Vermehrung, Entwicklung und Verbreitung gegeben. Im zweiten Teil folgen dann Bestimmungstabellen über die frei- und parasitisch-lebenden Formen. Jede der oft zum Verwechseln ähnlichen Gattungen wird zumindest durch eine Strichzeichnung bildlich dargestellt. Die Technik des Sammelns und die verschiedenen Fixierungs- und Untersuchungsverfahren behandelt der dritte Teil des Buches. Je nach dem Vorkommen der Nematoden werden die Methoden für freilebende Arten, für Pflanzen-, Insekten- und schließlich für Wirbeltierparasiten geschildert. Der vierte Teil behandelt die Pflanzenparasiten und enthält auch eine Bestimmungstabelle für die an Pflanzen auftretenden Nematodenarten, deren Lebensweise, Schaden, Verbreitung und Bekämpfung eingehend erläutert wird. Dabei haben die Hauptschädlinge eine fast monographische Bearbeitung erfahren. Im fünften Teil werden in ähnlicher Weise die landwirtschaftlich wichtigen Insektenparasiten besprochen. Mehrere Tabellen erleichtern die Bestimmung dieser artenreichen Nematodengruppe. Jedem der einzelnen Abschnitte ist ein ausführliches Verzeichnis des Schrifttums beigegeben. Eine Inhaltsübersicht beschließt das reich illustrierte und durchweg mit guten Strichzeichnungen versehene Buch. Weniger gut sind infolge des schlechten Papiers die photographischen Abbildungen wiedergegeben.

Goffart (Kiel-Kitzeberg).

Schneider, H., Wintergersten-Schädigung durch Zwergzikade. (Dtsch. Landwirtsch. Presse. Bd. 61. 1934. S. 435.)

Infolge des warmen und trockenen Frühsommers konnte sich *Cicadula sexnotata* so stark vermehren, daß sie auch die Wintergerste in Mitteldeutschland stellenweise gefährdete. Befallene Pflanzen zeigen röt-

lich gefärbte Blätter, die auf der Außenseite mit einer Wachsschicht überzogen zu sein scheinen. Bei näherer Betrachtung sind helle durchscheinende Stellen erkennbar, die etwa an den Fensterfraß des Getreidehähnchens (L e m a) erinnern. Die Larven schädigen die Pflanzen in der gleichen Weise wie die Alttiere. Empfohlen wird, bei starkem Befall das Getreide grün abzumähen und dann so umzupflügen, daß man in der Mitte beginnt und zuletzt die Feldränder umackert. Auf diese Weise werden die Zikaden nicht noch weiter in den unbefallenen Teil des Feldes hineingetrieben. Eine unmittelbare Bekämpfung mit Fangmaschinen (fahrbare mit Fliegenleim bestrichene Fangvorrichtungen) verspricht meist wenig Erfolg.

G o f f a r t (Kiel-Kitzeberg).

Oekologie, biologische und chemische Bekämpfung tierischer Schädlinge.

Kolubajiv, S., D i e E r g e b n i s s e d e r Z ü c h t u n g v o n p a r a s i t i s c h e n I n s e k t e n a r t e n a u s i h r e n W i r t e n i n d e r S t a a t l i c h e n V e r s u c h s a n s t a l t i n P r a g i n d e n J a h r e n 1929—1933. (Časopis Čsl. Spol. Entom. Bd. 31. 1934. S. 59—136.) [Dtsch. Zusfassg.]

Eine Zusammenstellung der in der Versuchsanstalt für Forstschutz in Prag aus wichtigen Forstschädlingen und anderen Insekten gezüchteten Parasiten. Bemerkenswerte Einzelheiten sind folgende: Aus Nonnenraupen wurde eine der gewöhnlichen Nonnentachine, P a r a s i t i g e n a s e g r e g a t a täuschend ähnliche Tachine T r i c h o l y g a s o r b i l l a n s Wied. gezüchtet, aus dem Schwammspinner B a n c h u s f e m o r a l i s, aus E v e t r i a b u o l i a n a H a b r o b r a c o n s t a b i l i s Wesm. Neu ist die Beobachtung, daß C a r a b u s g l a b r a t u s bis über 2 m auf die Bäume hinaufsteigt, um nach Art des Puppenräubers Nonnenraupen nachzustellen.

K. F r i e d e r i c h s.

Boling, I., Z u r B i o l o g i e u n d Z u c h t d e r S c h l u p f w e s p e A n g i t i a a r m i l l a t a G r. (H y m e n o p t. I c h n e u m. O p h i o n.) (Arb. Biol. Reichsanst. Land- u. Forstwirtsch. Bd. 20 3. 1933 3. S. 237—244; 1 Abb.)

In Mehlmottenkulturen fand sich die Schlupfwespe (Ophionine) A n g i t i a a r m i l l a t a ein und parasitierte die Raupen. Sie erwies sich als durch Generationen hindurch im Labor züchtbar und verhält sich ähnlich wie die bekannte N e m e r i t i s c a n e s c e n s. Die gesamte Entwicklung dauert 4 Wochen, die Imago lebt bis 50 Tage lang. Parthenogenese ergibt nur ♂♂, aber auch bei Paarungszucht treten allgemein 80% ♂♂ auf.

K. F r i e d e r i c h s.

Godfrey, H. G., E x p e r i m e n t s o n t h e c o n t r o l o f t h e r o o t - k n o t n e m a t o d e i n t h e f i e l d w i t h C h l o r o p i c r i n a n d o t h e r c h e m i c a l s. (Phytopathology. Vol. 25. 1934. p. 67—90.)

Zur Bekämpfung des den Ananas-Kulturen auf Hawai sehr gefährlich werdenden Wurzelgallen-Nematoden, H e t e r o d e r a m a r i o n i, wurden verschiedene Feldversuche mit Chlorpikrin, Schwefelkohlenstoff, Cyanogas und Natriumxanthat durchgeführt. Um die Wirkung der sich entwickelnden Gase zu erhöhen, wurde der Boden z. T. mit Dachpappe bedeckt. Die Wirkung der einzelnen Mittel wurde durch Zählen der Gallen an eingesäten Fangpflanzen, durch Untersuchungen von am Rande stehenden Ananas-

pflanzen und endlich durch Ertragsfeststellung ermittelt. Gute Erfolge wurden mit Chlorpikrin erzielt, wenn es in Bodenlöcher eingegossen wurde. 1 kg Chlorpikrin je Ar brachte 14% Ertragssteigerung, 1½ kg je Ar ergab bei einer Abnahme der Bodenverseuchung von 94,5% eine Ertragssteigerung von 26%, bei 1,8 kg je Ar wurde eine fast ebenso starke Abnahme der Bodenverseuchung und eine Ertragssteigerung von 31,4% erzielt. Noch höhere Erträge wurden erreicht, wenn der Boden nach der Behandlung mit Dachpappe bedeckt wurde. Die Ertragssteigerung betrug dann bei 1,9 kg Chlorpikrin je Ar 52,3%. Im Gegensatz hierzu wurden nach einer Bodenbehandlung mit 10 kg Schwefelkohlenstoff je Ar eine Abnahme der Verseuchung um 48% und eine Ertragssteigerung von nur 29,3% erzielt. Die übrigen Mittel brachten einen noch weit geringeren Mehrertrag, wobei sie sich gleichzeitig nicht mehr bezahlt machten. Nach der aufgestellten Kostenberechnung ist jedoch die Verwendung von Chlorpikrin durchaus wirtschaftlich.

Goffart (Kiel-Kitzeberg).

Godfrey, G. H., Oliveira, Jul., and Hoshino, H. M., Increased efficiency of chloropicrin with better confinement of the gas. (Phytopathology. Vol. 24. 1934. p. 1332—1346.)

Die Wirkung des Chlorpikrins bei der Bekämpfung von Wurzelgallennematoden (Heterodera radicicola) konnte erheblich gesteigert werden, wenn man den Boden nach der Behandlung mit Papier bedeckt, das mit einer dünnen Schicht Tierleim bestrichen war. Wurden unter diesen Umständen 30 g Chlorpikrin je Quadratmeter in geschlossenen Räumen angewandt, dann war der Erfolg fast 100proz. Ferner wurde auch eine erhebliche Wuchssteigerung bei den nachgebauten Tomatenpflanzen erzielt. Nach 30 Tagen betrug das Gewicht einer auf vorbehandeltem Boden stehenden Pflanze das 7fache des Gewichts einer Kontrollpflanze von unbehandeltem Boden. Anderseits werden durch Chlorpikrin die für das Wachstum von Leguminosen notwendigen Knöllchenbakterien vernichtet. Lockerer Zustand des Bodens und wenig Feuchtigkeit sind Vorbedingungen für einen guten Erfolg der Behandlung. Goffart (Kiel-Kitzeberg).

Godfrey, G. H., The confinement of chloropicrin and other gases for fumigation purposes. (Phytopathology. Vol. 24. 1934. p. 1366—1373.)

Verf. beobachtete, daß die Wirkung von Chlorpikrin und Schwefelkohlenstoff gesteigert werden kann, wenn der Boden nach der Behandlung mit Papier bedeckt wird, das mit bestimmten Stoffen getränkt bzw. bestrichen war. Am wirksamsten waren Kolloide, besonders Leim, Gelatine und Stärkekleister. Wasserglas war für Laboratoriumszwecke brauchbar, bei Einwirkung stärkeren Sonnenlichtes entstanden jedoch Risse. Geringe Wirkung zeigten ölhaltige oder mit Firniß bestrichene Papiere. Bei der Schwefelkohlenstoffbehandlung wurden die besten Erfolge mit Kaseinleim erhalten; alle anderen Verfahren versagten mehr oder weniger. Das Papier muß an den Ecken befestigt werden und dem Boden dicht anliegen.

Goffart (Kiel-Kitzeberg).

Tomaszewski, W. und Nitsche, G., Die Kohlfliegenbekämpfung im Feld- und Gartenbau. (Dtsch. Landwirtsch. Presse. Bd. 61. 1934. S. 191—192.)

Zur Kohlfliegenbekämpfung hat sich außer Sublimat in 0,06proz. Lösung auch Obstbaumkarbolineum als brauchbar erwiesen. Die einfachen Obst-

baumkarbolineen gaben in 0,3proz., die konzentrierten in 0,15proz. Lösung die besten Ergebnisse. Da die Karbolineen auch in kaltem Wasser leicht löslich sind, ist ihre Anwendung einfacher; zudem ist die Behandlung um 1,— bis 1,50 RM. je 1/4 ha billiger als das Sublimatverfahren. Bei rechtzeitiger Anwendung (4 Tage bzw. unter Umständen nochmals 14 Tage nach dem Pflanzen) des einen oder anderen Verfahrens kann Kohlfliegenschaden verhindert werden. Goffart (Kiel-Kitzeberg).

Smith, R. A., Meyer, H. U., and Persing, C. O., Nicotine vapor in Codling moth control. (Journ. econom. Entom. Vol. 27 6. 1934 12. p. 1192—1195, 1 fig.)

Nachdem Vorversuche gezeigt hatten, daß vernebeltes Nikotin sehr giftig für Apfelmotten ist, wurde ein geeigneter Apparat für die praktische Vernebelung konstruiert, der mit komprimierter Luft arbeitet. Die Wirkung des Giftnebels hängt von seiner Dichte in der das Insekt umgebenden Luft ab und von der Länge der Zeit, in der das Insekt dem Nebel ausgesetzt ist. Zur Erzielung einer maximalen Wirkung wurde ein offenes Zelt gebraucht, das Bäume von 8 m Höhe und 8 m Breite umschließen kann. Damit wird man zugleich unabhängig von der Witterung. In dieser Weise konnte 100-prozentige Wirkung mit 10 ccm „Black leaf" je Baum erzielt werden, wenn die Behandlung 1 Min. dauerte. Die Kosten scheinen, auch wenn die Behandlung etliche Male wiederholt wird, viel niedriger zu sein als bei Anwendung von Spritzmitteln. Möglicherweise wird sich die ganze Bekämpfung stark vereinfachen, indem man solchermaßen die Motten auf einmal, wenn das Gros fliegt, vernichtet und damit zugleich Blattläuse u. a. Ohne Zelt, bei ruhiger Luft, mögen 30 ccm je Baum ausreichen. Man hofft, im Jahre 1935 den praktischen Wert des Verfahrens im Vergleich mit Spritzen und Stäuben zu ermitteln. K. Friederichs.

Zacher, F., Die Bekämpfung der Kornkäferplage. (Ztschr. f. d. ges. Getreide-, Mühlen- u. Bäckereiwesen. Jahrg. 1934. Sonderdr. 6 S.)

Der vom Verf. auf 100 Millionen Mark im Durchschnitt der Jahre berechnete Schaden durch den Kornkäfer war für 1934 noch höher zu bemessen. Eine Reihe warmer Sommer und die Überfüllung vieler Läger hat Massenvermehrung des Käfers verursacht. Ein außerordentlich großer Teil der deutschen Läger ist heute mit Kornkäfern verseucht. Jeder einzelne Fall hat dabei seine Probleme, so daß nicht jedes der bekannten Mittel in jedem Falle hilft. Diese werden aufgeführt, ihre Anwendung und Wirkung besprochen: Kälte und Hitze, pulverförmige Streumittel, Spritzmittel wie Grodyl, Vergasung mit Blausäure, Äthylenoxyd oder Areginal, Sauberhaltung des Lagers. Neu geerntetes Getreide wird ebensowohl wie älteres befallen. K. Friederichs.

Wahl, B., Erfahrungen über die San José-Schildlaus. (Nachrichtenbl. f. d. Dtsch. Pflanzenschutzdienst. Jahrg. 15. 1935. S. 40 und 47—48.)

Die 1931 in Österreich erstmalig festgestellte San José-Schildlaus hat nach den Beobachtungen im Gegensatz zu den klimatisch günstigeren Verhältnissen in gewissen Teilen der Vereinigten Staaten 2 bis höchstens 3 Generationen. Immerhin kann der Schädling den Winter überdauern. Bekämpfungsversuche mit Obstbaumkarbolineum zeigten, daß 15proz. Emulsionen

der einfachen und 8proz. der doppelten Obstbaumkarbolineen eine fast 100proz. Abtötung hervorrufen. Dieses Verfahren kommt aber mehr als vorbeugende Sicherheitsmaßnahme in Betracht, da die tatsächlich befallenen Bäume in Österreich verbrannt und somit am sichersten unschädlich gemacht werden. Für die Einfuhr von Baumschulerzeugnissen ist als vorbeugende Maßnahme die Blausäurebegasung (1 Vol.-% 1 Std. lang bei wenigstens 10° C) vorgeschrieben. Dieses Verfahren hat sich mit gewissen Ausnahmen bewährt.

Goffart (Kiel-Kitzeberg).

Mansfeld, K., Eine wirksame Sperlingsbekämpfung. (Nachrichtenbl. f. d. Dtsch. Pflanzenschutzdienst. Jahrg. 15. 1935. S. 45—47.)

Als sehr brauchbar hat sich die Schwingsche Spatzenfalle erwiesen. Ein Fangkäfig aus Maschendraht enthält auf der Oberseite eine vertieft angebrachte Futterschale, die nur durch Heraufspringen des Sperlings auf den Rand der Blechschale erreichbar ist. Durch das Gewicht des Vogels dreht sich jedoch die Schale, so daß der Sperling in den Käfig gleitet. Darauf schnellt die Schale wieder in die waagerechte Lage zurück. Die Menge der gefangenen Spatzen richtet sich hauptsächlich nach dem Stand der Falle. In den Sommermonaten (Mai bis Oktober) lassen sich auf diese Weise 1000 Jungspatzen und mehr fangen. Goffart (Kiel-Kitzeberg).

Meyer-Hermann, K., Rumetan-Johannisbrotschrot, ein brauchbares Mittel zur Wühlmausbekämpfung. (Nachrichtenbl. f. d. Dtsch. Pflanzenschutzdienst. Jahrg. 15. 1935. S. 8—29.)

Verf. machte die Beobachtung, daß von allen Ködern Johannisbrot am meisten von den Wühlmäusen bevorzugt wird. Zur Bekämpfung wurde Johannisbrotschrot mit „Rumetan" im Verhältnis 100 : 2 gemischt und zur Erhöhung der Haftfähigkeit des Köders etwas Dextrinwasser hinzugesetzt. Das Mischen erfolgt zweckmäßig in einer Beiztrommel. Alsdann werden die Köder mit einem Löffel in die Gänge gelegt. 750 g Rumetan-Johannisbrotschrot genügen bei diesem Verfahren für die Behandlung eines Morgens und kosten nur 62 Rpfg. Damit die Wühlmäuse nicht mißtrauisch werden, empfiehlt es sich, bereits einige Tage vorher etwa 250 g unvergiftetes Johannisbrotschrot auszulegen. Goffart (Kiel-Kitzeberg).

v. Winning, E., Der Stand der Ausbreitung der Bisamratte in Deutschland. (Nachrichtenbl. f. d. Dtsch. Pflanzenschutzdienst. Jahrg. 15. 1935. S. 54—56.)

Nach dem neuesten Stand hat die Bisamratte besonders in Schlesien und Bayern an Ausbreitung zugenommen. Außer einer räumlichen Ausbreitung fand auch eine Verdichtung des Befalls statt. Die Bisamratte rückt nunmehr in breiter Front auf die Ostgrenze Württembergs zu. Die Zahl der erlegten Tiere nahm vor allem in Anhalt zu; im übrigen blieb sie mit einigen Ausnahmen gegenüber dem Vorjahre wenig verändert.

Goffart (Kiel-Kitzeberg).

Tierkrankheiten. Tierparasiten.

Fyg, W., Krankheiten der Bienenkönigin. (Schweiz. Bienenztg. Jahrg. 1934. Sonderdr. 24 S., 10 Abb.)

Der Imker kann eine erkrankte Königin heute in der Schweiz leicht durch eine gesunde ersetzen; gleichwohl ist es von Wert, die vielen Krankheiten zu kennen, deren acht beschrieben werden. Bezüglich der „Eischwarz-

sucht" spricht sich Verf. dahin aus, daß sie durch einen hefeähnlichen Parasiten verursacht werde, der auch in Fadenform auftrete und vermutlich zwischen Hefen und Fadenpilzen stehe. Er befällt auch Enddarm und Giftblase; die Krankheit kann daher nicht mehr Eischwarzsucht genannt werden, und da „Schwarzsucht" die sog. Waldtrachtkrankheit bezeichnet, so sollte jene Krankheit der Königin „Melanose" heißen. K. Friederichs.

Lawrence, R. F., The prostigmatic Mites of South African Lizards. (Parasitology. Vol. 27 1. 1935 3. p. 1—45, 22 figs.)

Die auf südafrikanischen Eidechsen lebenden prostigmatischen Milben werden beschrieben und abgebildet. Es sind viele neue Arten darunter. Die dortigen Eidechsen haben, je nach der Familie, entweder prostigmatische Milben oder mesostigmatische oder keine. Die letzteren Eidechsen haben eine abweichende Lebensweise, graben im Boden oder leben auf Bäumen. Die Milben fehlen, wo keine Schuppen oder keine dachziegelförmigen Schuppen vorhanden sind, wo die Gliedmaßen degeneriert sind und bei einzelnen Arten von Gattungen, deren sonstige Arten parasitiert werden.

K. Friederichs.

Beal, J. A., Relation of air and bark temperatures of infested Ponderosa pines during subzero weather. (Journ. econom. Entom. Vol. 27 6. 1934 12. p. 1132—1139.)

Starker Winterfrost verursacht eine gewisse Sterblichkeit unter den Borkenkäfern (Dendroctonus brevicornis) von Pinus ponderosa in Oregon. Stündliche Messungen zeigten, daß die Temperatur unter der Rinde bei stark fallender Außentemperatur, wenn diese bis — 3° C herabging, um 8—29 Fahrenheitgrade höher war, wobei die hohen Temperaturen unter dicker Rinde gefunden wurden. Bei Temperaturen von — 12, — 10 und — 8° überlebten 44,5 bzw. 36,0 und 27,6% von den Käfern. Sonnenschein während der Kälte hat wenig Bedeutung, weil auf ihn die Nachtkälte folgt. Rückstrahlung des Sonnenscheins vom Schnee aus erwärmt alle Seiten des Baumes gleichmäßig. K. Friederichs.

Verschiedenes.

Pellegrini, F., Contribution à l'étude de la microbiologie du "B. subtilis". Le "B. subtilis" comme cause de septicémie et de mort. (Soc. Intern. Microbiol. Boll. della Sez. Ital. Vol. 6. 1934. p. 492—500.)

Nachdem verschiedentlich Untersuchungen darüber angestellt worden sind, ob Bac. subtilis für Menschen und Tiere pathogen werden kann, und die gemachten Beobachtungen teils für, teils gegen eine solche Annahme sprechen, kann Verf. nunmehr über einen klinischen Fall berichten, der seines Erachtens den eindeutigen Beweis erbracht hat, daß Bac. subtilis in der Tat schwere septische Erkrankungen auch beim Menschen auslösen kann. In dem beschriebenen Fall nahm die Krankheit einen tödlichen Verlauf. Verf. meint, daß dem Bac. subtilis in Zukunft erhöhte Aufmerksamkeit gewidmet werden muß, und daß er für die Ätiologie verschiedener infektiöser Erkrankungen heranzuziehen ist.

Bortels (Berlin-Dahlem).

Hallauer, C., Vergleichende Untersuchungen über das Verhalten von Bakterien und übertragbarem Lysin im Ultraviolettspektrum. (Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. 117. 1935. S. 18—25.)

Es wurde das Verhalten von 4 Bakteriophagen und vergleichsweise 31 Arten von Mikroorganismen im lang- und kurzwelligen Ultraviolettspektrum untersucht. Dabei ergab sich, daß die Lysine hinsichtlich ihrer Lichtresistenz, der Ausbildung von Empfindlichkeitsmaxima und des spektralen Bereiches ihrer Lichtempfindlichkeit annähernd mit den geprüften Mikroorganismen übereinstimmten. Bestimmte Anhaltspunkte für die biologische Natur des übertragbaren Lysins können aus diesen Feststellungen nicht gezogen werden; denn es sind folgende Möglichkeiten denkbar: 1. das Lysin ist ein selbständiger Mikroorganismus und hat eine ähnliche Lichtabsorption wie die Bakterien, 2. das Lysin ist ein Bakterienderivat und weist deshalb eine den Bakterien ähnliche Lichtabsorption auf, 3. das Lysin ist an ein bakterielles Derivat adsorbiert; seine eigene Lichtabsorption ist unbekannt.

Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Hasché, E. und **Leunig, H.**, Über die Wirkung von Ultrakurzwellen auf Bakterien. (Deutsche med. Wochenschr. Jahrg. 61. 1935. S. 1193—1195.)

Staphylokokken und Colibakterien in destilliertem Wasser und in Nährbouillon wurden in ihrem Wachstum durch ultrakurze Wellen ($\lambda = 3{,}5$ m) sowohl in schwachen Dosen wie auch mit Hilfe der größtmöglichen Feldstärken, die gegenwärtig erzeugt werden können, in vitro nicht beeinflußt. Dieselbe negative Wirkung ergab sich gegenüber keimhaltigem Leitungswasser. Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Herčík, F., Über die biologische Wirkung von H-Strahlen. (Klin. Wochenschr. Jahrg. 14. 1935. S. 1222—1223.)

Wenn Mikroorganismen der Wirkung von α-Strahlen ausgesetzt sind, werden sie rasch getötet. Eine abtötende Wirkung dieser Strahlen außerhalb ihrer Reichweite wurde jedoch bisher noch nicht festgestellt. Sie wurde vom Verf. erstmalig gegenüber Bact. prodigiosum nachgewiesen. Versuchsanordnung: Auf Agarplatten wurde eine gut durchgeschüttelte Bakteriensuspension aufgetragen, 5 Min. stehen gelassen, dann abgegossen. Nach vorsichtigem Trocknen der Agaroberfläche wurde auf eine bestimmte Stelle der Kultur eine starke Poloniumquelle so eingestellt, daß der Abstand zwischen der Quelle und der Agaroberfläche 4—15 cm betrug. Nach einer Expositionszeit von 1—24 Std. war immer ein großer Teil der Kolonien (bis zu 52%) auf der bestrahlten Fläche vernichtet. Offenbar handelt es sich dabei um die Wirkung von H-Strahlen, die aus zertrümmerten Stickstoffmolekülen stammen müßten. Damit wäre zum erstenmal die durch Zertrümmerung der Materie freigewordene Energie biologisch nachgewiesen und gemessen. Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Chargaff, E., Über das Fett und das Phosphatid der Diphteriebakterien. (Ztschr. f. physiol. Chem. Bd. 218. 1933. S. 223—240.)

Im Gegensatz zu den überaus fettreichen säurefesten Bakterien enthalten die Diphteriebakterien nur relativ geringe Mengen von in organischen Lösungsmitteln löslichen Körpern, nämlich etwa 4% Fett und 0,4% Phosphatid. Daneben sind in sehr geringer Menge noch 2 andere Substanzen vorhanden; eine phosphorfreie Fettfraktion und ein Wachs. Das Fett ist offenbar kein Glycerid. Es enthält eine große Menge von freier Palmitinsäure und einer ungesättigten Säure $C_{16}H_{30}O_2$ (Palmitoleinsäure) neben

einer geringen Menge Neutralfett. Die unverseifbaren Bestandteile des Fettes enthalten stark ungesättigte Substanzen und keine Sterine. Das Phosphatid der Diphteriebakterien lieferte bei der Hydrolyse Aldohexosen, Fettsäuren (Palmitinsäure) und eine hochmolekulare Verbindung.

R. Koch (Berlin).

Newman, M. S. und **Anderson, R. J.**, Über die Polysaccharide der Leprabazillen. (Ztschr. f. physiol. Chem. Bd. 220. 1933. S. 1—4.)

Die mit Alkohol-Äther aus feuchten Leprabazillen extrahierbaren Polysaccharide ließen sich durch Acetylierung in eine kristallisierte und eine amorphe Fraktion zerlegen. Die Kristalle bestanden aus Trehaloseoktaacetat, nach der Verseifung entstand Trehalose. Die Hauptmenge der Zucker bildete die amorphe Fraktion, die aus höheren Polysacchariden, insbesondere Pentosen, bestehen dürfte. R. Koch (Berlin).

Wrede, F. und **Rothhaas, A.**, Über das Violacein, den violetten Farbstoff des Bacillus violaceus. I. (Ztschr. f. physiol. Chem. Bd. 223. 1934. S. 113—118.)

Der violette Farbstoff des Bacillus violaceus wurde in reiner, kristallisierter Form gewonnen und chemisch untersucht. Die Analysen der mehrfach umkristallisierten Substanz stimmten auf die Formel $C_{42}H_{35}O_6N_5$ oder $C_{\,0}H_{42}O_8N_6$. Die Substanz ist mit Palladiumkohle hydrierbar. Das Farbstoffmolekül addiert 1 Molekül Salzsäure bzw. Schwefelsäure. Mit Essigsäureanhydrid-Natriumacetat sowie mit Alkali wird das Molekül in 2 Teile zerlegt. Bei der Acetylierung nimmt der dabei entstehende in Alkali mit gelbroter bis orangeroter Farbe lösliche Farbstoff 5 bzw. 6 Acetylgruppen auf. R. Koch (Berlin).

Kruse, W. und **Fischer, M.**, Die wissenschaftlichen Grundlagen des neuen Systems der silbernen Antisepsis und Chlordesinfektion. (Arch. f. Hyg. u. Bakt. Bd. 113. 1934. S. 46—62.)

Völlig reines Silber besitzt keine oligodynamischen Eigenschaften, sondern erwirbt sie erst dadurch, daß es sich durch äußere Einflüsse (Ozon, Wasserstoffsuperoxyd, Chlor) oberflächlich in schwer, aber doch eben lösliche Verbindungen umsetzt, die antiseptisch wirken. Die „natürliche Oligodynamie“ des Silbers aber ist eine sehr ungewisse Größe. Dagegen kann man mit Hilfe des Anodenstromes dem Silber sehr schnell und leicht oligodynamische Kräfte in jeder beliebigen Höhe verleihen. Konzentrierte „aktive Silberflüssigkeit“ (Silbermolke) tötet fast alle Bakterien, auch bei starker Einsaat (Millionen im Kubikzentimeter), binnen 15 Min., Cholera- und Diphtheriebakterien, sporenfreie Heu- und Milzbrandbazillen schon in 100facher Verdünnung. Ruhr-, Paratyphus-, Pseudodiphtheriebakterien, Bier- und Rosahefen wurden in 1 Std. durch konzentrierte Molke abgetötet, Gasbrandbazillen in 3 Std., Säurefeste, Strahlen- und Schimmelpilze erst nach 3 bis 24 Std. Sporen gegenüber war keine Wirkung bemerkbar (aber auch 1prom. Silbernitratlösung versagt hier). Ebensowenig werden Bakteriengifte, -antigene und -antikörper und bezeichnenderweise auch Bakteriophagen durch Silber geschädigt. In einer Konzentration von 1 : 10 000 und mehr ist Silbermolke ein brauchbarer Ersatz für die bisher üblichen, meist in größeren Mengen giftigen Konservierungsmittel.

Noch stärkere Wirkung als die kolloidalen Silberlösungen hat das „aktive Silberpulver“, das bereits in 1 proz. Lösung Schimmel- und Strahlenpilze im Wachstum endgültig hemmt und in stärkeren Konzentrationen ziemlich schnell abtötet.

Zur groben Desinfektion (der Haut, Hände usw.) ist Silber weniger geeignet und zu teuer, hierfür kommt in erster Linie die „physiologische Chlorlösung“ in Frage. Der aus einer Platinanode und 2 Kathoden aus Platin oder aus anderem Metall bestehende Taucher (Chlor- oder Sina-Aktivator) wird mit Gleichstrom beschickt und erzeugt unter starker Gasentwicklung in der Sekunde in der physiologischen Kochsalzlösung bei 4 Ampere Stromstärke 0,7 mg, in der Minute also 42 mg aktives Chlor. In der Verdünnung 1 : 250 000 tötet Chlor schon in 1 Min. fast sämtliche Bakterien (bis auf gewisse Wasserbakterien), Pilze erst nach längerer Zeit oder gar nicht (Aspergillus niger). Dagegen werden Sporen in 2 prom. Lösung schon in 5—10 Min. vernichtet. Voraussetzung zu allen diesen Leistungen ist aber, daß neben den Bakterien wenig organische Stoffe vorhanden sind. Solche setzen die Wirkungen, namentlich in Nährböden, stark herab. Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Lieb, F., Über die oligodynamische Wirkung des Silberchlorids. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 133. 1935. S. 308—310.)

Das geschmolzene Silberchlorid besitzt zum Unterschied vom metallischen Silber sogleich nach dem Erstarren aus seiner Schmelze oligodynamische Wirkung und behält diese auch bei Einwirkung von fließendem Wasser wenigstens 6 Monate lang bei (metallisches Silber verliert seine Wirkung schon nach etwa 24 stünd. Einwirkung von fließendem Wasser).

Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Hornung, H., Zephirol, ein neues Desinfektionsmittel. (Ztschr. f. Immunitätsforsch. u. exper. Therapie. Bd. 84. 1935. S. 119—135.)

Das neue, von der I. G.-Farbenindustrie hergestellte Desinfektionsmittel Zephirol, das Chlorid eines basischen Phenolderivats, wurde in seiner Wirksamkeit auf verschiedene Bakterienarten mit einer Reihe der gebräuchlichsten Desinfektionsmittel verglichen. Hierbei zeigte sich, daß es im Suspensionsversuch dem Sublimat, Clorina, Sagrotan, Lysol, Phenol, Bakterogran, Lysoform und dem Liquor formaldehydi saponatus überlegen ist, und zwar sowohl gegenüber vegetativen Bakterienformen (Staphylokokken, hämolytischen und vergrünenden Streptokokken, Enterokokken, Coli, Typhus, Paratyphus A und B, Pyocyaneus) als auch gegenüber Milzbrandsporen, die an Seidenfäden angetrocknet waren. Im übrigen entspricht Zephirol weitgehend den Forderungen, die an ein gutes Desinfektionsmittel gestellt werden: leichte Löslichkeit in Wasser, Ungiftigkeit und Unschädlichkeit, Licht-, Luft- und Temperaturbeständigkeit, gute Benetzung der zu desinfizierenden Gegenstände, Geruch- und Farblosigkeit, Metall wird nicht angegriffen. Als ein gewisser Nachteil könnte angesehen werden, daß Zephirol in seiner Wirkung durch Seifenzusatz ungünstig beeinflußt wird.

Es wird noch auf die Tatsache hingewiesen, daß die Formaldehydpräparate Lysoform und Liquor formaldehydi saponatus zwar eine gute Wirkung auf Sporen entfalten, daß sie aber in den gebräuchlichen Konzentrationen gegenüber Staphylokokken und Streptokokken fast unwirksam sind. Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Schwartz, V., Versuche über Regeneration und Kerndimorphismus der Ciliaten. (Nachr. Ges. Wiss. Göttingen, Math.-Phys. Kl. Biologie, N. F. Bd. 1. 1934. S. 143—155, 14 Abb.)

Mit einer flachgeschliffenen feinen Nähnadel wurden Operationen ausgeführt an Paramaecium (auf Objektträger in der feuchten Kammer gezüchtet) und an Stentor (in Boverischalen gezüchtet). Entfernung sämtlicher Mikronuclei bei Stentor zeigte, daß sie für alle vegetativen Funktionen entbehrlich sind, denn es treten keine Ausfallserscheinungen ein; dagegen zeigte Entfernung des Makronucleus, daß dieser für den normalen Stoffwechsel und für die Einleitung des Teilungs- und Regenerationsvorganges unentbehrlich ist. Makro- und Mikronucleus regenerieren sich nicht auseinander. Paramaecien ohne Mikronucleus sind in den vegetativen Funktionen gehindert, und ihr Vermögen zur Formbildung ist vermindert. Die Bedeutung der beiden Kernarten ist also für manche Zellfunktionen bei St. und P. verschieden. K. Friederichs.

Cutler, D. Ward, and Crump, L. M., The effect of bacterial products on amoebic growth. (Journ. Exper. Biol. Vol. 12. 1935. p. 52—58.)

Durch Filtrate, die aus jungen Kulturen von einem Bakterium, „YB" genannt, sowie aus B. prodigiosus hergestellt worden waren, wurde das Wachstum von Hartmanella hyalina fast gar nicht vermindert.

Ein Filtrat, hergestellt aus aufgelösten Zellen von B. mycoides, verhinderte die Reproduktion bei Naegleria gruberi, beschleunigte aber die Zystenbildung. Nicol (Rothamsted).

Griepenburg, W., Die Protozoenfauna einiger westfälischer Höhlen. (Sitzgsber. Ges. naturf. Freunde Berlin. Jahrg. 1933. S. 78—92.)

Verf. hat die Protozoenfauna von 3 Höhlen bei Milspe und einer bei Berghausen untersucht. In den Höhlen befinden sich Bäche und Tümpel. Durch die Bäche können die Protozoen gegen die Strömung in die Höhlen gelangen. Der Hauptweg der Einwanderung ist aber neben mehreren anderen das Sickerwasser von der Erdoberfläche her. Im ganzen wurden in Gewässern, an Fleischköder und in feuchter Erde 8 nackte und 23 beschalte Amöben gefunden, 38 Ciliaten und von Sporozoen eine Monocystis. Über die Flagellaten will Verf. gesondert berichten. „Troglobionte" Protozoen gibt es nicht, alle in Höhlen gefundenen sind vulgäre Arten der Erdoberfläche.

K. Friederichs.

Gause, G. F., Untersuchungen über den Kampf ums Dasein bei Protisten. (Biol. Zentralbl. Bd. 54 9. 10. 1934 9. 10. S. 536—547, 5 Diagr.)

Nach mathematischer Berechnung muß eine aus homogenen „Opfern" und homogenen „Räubern" bestehende Tierbevölkerung in einem begrenzten Mikrokosmos trotz Konstanz aller äußeren Faktoren periodische Schwankungen der Individuenzahl beider Arten erfahren. Ein Versuch mit der Nahrungskette Bacillus pyocyaneus — Paramaecium — Didinium ergab aber nicht solche Schwankungen, sondern die Paramaecien wurden vertilgt, und damit verschwanden auch die Didinien. Während i. a. Seltenerwerden der Beute die Wahrscheinlichkeit der Be-

gegnung derselben mit dem Verfolger herabsetzt und damit dessen Vermehrung verringert, begegnet Didinium seinen Beutetieren, nachdem sie selten geworden sind, ebenso oft, weil es dann ebenso viele Nachkommen hervorbringt als bei starker Fütterung, aber sehr kleine. Wenn aber durch Verwendung von „Hafernährboden mit Sediment" den Paramaecien die Möglichkeit sich zu verstecken gegeben wurde, so starben nach Vernichtung der erreichbaren P. die Didinien aus. Das Ergebnis dieser und anderer Versuche war, daß die in der Natur zu beobachtenden Schwankungen jenes Zahlenverhältnis nicht auf der Wechselwirkung zwischen den Tieren selbst beruhen, wie das die Mathematiker voraussetzten, sondern offenbar dadurch entstehen, daß ständig äußere Einflüsse einwirken, die unter natürlichen Bedingungen sehr verschiedener Art sein können. K. Friederichs.

Hetherington, A., The rôle of Bacteria in the growth of Colpidium colpoda. (Physiol. Zoology. Vol. 7. 1934. p. 618—641.)

Die alten Infusionen mit ihrer unkontrollierbaren Bakterienflora wurden teils durch Reinkulturen, teils durch solche mit bestimmten Bakterien oder bestimmtem anderem lebenden Futter ersetzt. Entsprechende Versuche mit Colpidium colpoda ergaben folgendes: Es gedeiht nicht in einer Salzlösung (Petersschem Medium) mit toten Bakterien und mit sorgfältig gereinigten lebenden Bakterien nur einige Generationen lang. Ein ziemlich unregelmäßiges Wachstum fand in den meisten Fällen statt, wenn „ungereinigte" Bakterien gegeben wurden. Das beste Wachstum der Colpidien fand statt, wenn ein bestimmtes, nicht identifiziertes Bakterium gegeben wurde, das in der genannten Lösung sehr aktiv war. Aus den weiteren Ergebnissen sei noch hervorgehoben, daß die in wüchsigen Ciliatenkolonien vorherrschenden B., Nährlösungen zugesetzt, ein gutes Gedeihen der C. bewirkten, die Begleitbakterien solcher Kulturen dagegen nicht. Versuche zur Reinzucht in zusammengesetzten Nährlösungen mit festen Nahrungspartikelchen einschließlich toter B. verliefen negativ trotz des Gebrauches wechselnder Sauerstoffspannung und wechselnder sonstiger Bedingungen.

K. Friederichs.

Westphal, A., Studien über Ophryoscoleciden in der Kultur. (Ztschr. Parasitenkde. Bd. 7. 1934. S. 71—117.)

Experimentelle Schwierigkeiten physiologischer Untersuchungen über Ophryoscoleciden veranlaßten Verf., ein geeignetes Kulturverfahren zu schaffen. Das Gedeihen der Infusorien hängt von den besonderen im Pansen vorliegenden Bedingungen ab. Um auch in der Kultur die richtige Pansengärung zu erhalten, wurde täglich Verdünnung mit infusorienfreiem Panseninhalt vorgenommen, und es wurden anaerobe Bedingungen hergestellt. Harnstoffzusatz bewirkt die richtige Reaktion. Es zeigte sich, daß das Paraglykogen immer in der Nähe von Fibrillen abgelagert wird. Auch die Skelettplatten bestehen nur aus Fibrillen und Paraglykogen. Diese Platten, der Kern und die Vacuolen liegen im Entoplasma. Bildung von Cysten konnte nicht nachgewiesen werden.

Durch die O. wird nur derselbe physiologische Vorgang bewirkt wie auch durch die Fermente des im Pansen vorhandenen Speichels, so daß ein Nutzen für das Wirtstier nicht besteht, da sie Zellulose nicht spalten. Sie sind nur Kommensalen. K. Friederichs.

Abgeschlossen am 26. Februar 1936.

Zentralblatt für Bakt. etc. II. Abt. Bd. 94. No. 5|8.
Ausgegeben am 27. April 1936.

Preliminary Study of Penicillium egyptiacum v. Beyma.

By Younis S. Sabet.

[Botany Department, Egyptian University. Cairo.]

With 6 figures in the text.

Introduction.

During a study of soil fungi, the writer isolated, on the 5th April, 1932, an ascosporic species of Penicillium from sandy soil, at Burg El Arab, west of Alexandria; subsequently the species was found to exist in other types of soil (5). From the beginning the fungus was distinguished by the readiness with which it formed perithecia.

F. H. van Beyma, of the Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Holland, described the fungus (1) as a new species, with the name Penicillium egyptiacum.

I. Morphological and Physiological features. Culture character of Penicillium egyptiacum on various media.

Penicillium egyptiacum has been grown on thirty distinct media, including synthetic media, plant decoction agars, liquid media, and sterilised portions of a variety of plants. Perithecia were developed on every medium that was tested, but, as would be expected, the fungus showed a great deal of variation in the amount and habit of the mycelium and in the abundance of the crop of perithecia. On some media, the production of conidia was very scanty, while perithecia formed in large numbers (Fig. 1).



Fig. 1. Part of a colony to show tremendous number of perithecia. × 14,6.

A full description of the growth character of the fungus would be out of place in this preliminary account, but a brief statement of the more important features follows:

(a) Growth of mycelium. The conidiophores and conidia are colourless. On media of low nutritive value, such as Conn's and Coon's, the mycelium forms nearly transparent mats, thin, smooth, and shiny. Aerial mycelia often develop, the aerial hyphae frequently uniting to form long trailing strands, which usually branch and interlace. These strands bear the conidiophores, and as these develop the colonies become greyish.

On media rich in carbohydrates (starches and sugars), the dense prostrate mycelium is composed of relatively stout, crowded hyphae, and aerial growth is very abundant.

On some media, conidia may develop in large numbers here and there on the colonies, forming greenish patches; individual conidia, however, are colourless.

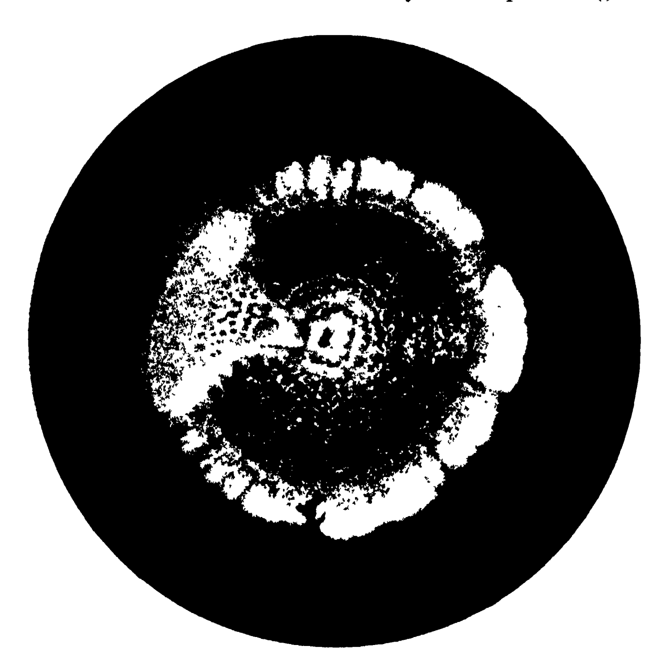


Fig. 2. Sectors on Brown's medium.

(b) Production of Perithecia. Perithecia were obtained in all the cultures that were prepared, but they usually formed rather scantily on media of low nutritive value. Heavy crop of perithecia developed on Richard's solution agar, and on plugs of carrot and potato. However, perithecia begin to develop on the second or third day after inoculation and by the time that the culture is a week old the abundant perithecia impart to it an obvious brown colour.

(c) Sectoring. Cultures often produce sectors freely. Most often, the culture shows a large sector bearing plenty of perithecia and few conidiophores, and a small sector in which the proportions are reversed. The large sector is usually brown, with a powdery appearance, the small is greenish, with a velvety surface (Fig. 2). Inoculations from the centre of the colony, the borders of sectors, and from the centre of each sector, all gave to colonies which more or less behaved in the same way as the original. This may denote that these sectors are false and not true saltations. At a later stage in the work, however, sectors distinguished by their abundant crops of conidia were observed; these appear to be stable in pure culture, and it seems probable that they will be found to give a constant strain of the fungus, marked by a relatively feeble capacity to form perithecia. In this connection reference may be made to a certain culture in which the source of nitrogen was ammonium chloride. In that culture conidia developed abundantly in

rather long chains, and the colony was distinctly green; it contained very few perithecia.

(d) Zonation. Zonation was observed occasionally on some media, such as Brown's medium and malt agar; it develops when the fungus is grown under reduced pressure (see p. 98).

The results of the culture indicate that Penicillium egyptiacum will grow readily on the media in common use, and that it can form perithecia on these media after two or three days growth at a suitable temperature (about 25° C.). The perithecia develop in tremendous numbers and, in a culture a week old, all stages in perithecial formation may be found passing from the margin to the middle of the colony.

2. Influence of Temperature. Cultures on malt agar were incubated at 18°, 22°, 26°, 30° and 34° C. The diameters of the colonies were measured at intervals of two days. It was found that the fungus grew fastest between 22° and 26° C.

3. Influence of pH. Lots of Richard's solution agar were made up and adjusted to different pH by the addition of phosphoric acid or potassium hydroxide. The following range of hydrogen ion concentration was used: 3.8, 4.8, 5.8, 6.8, 7.8 and 8.8. The diameters of the colonies were measured at intervals of two days. The fungus grew at approximately equal strength on all the media, though there were indications that growth was slightly higher at pH 3.8 and pH 6.8.

4. Influence of reduced pressure. Two batches of tubes of malt agar were inoculated and placed in two dessicators. One of these was left with its tap open, the other was connected to an air pump, exhausted for three hours and then closed. Both were left for a month at room temperature (18°—20° C.). When the second dessicator was opened, air was heard to rush through.

It was noted that the cultures under reduced pressure showed zonation, consisting of alternate bands of greenish conidial areas and dense compact brown perithecial ridges. The colonies grown under normal pressure were even without zones or greenish patches.

5. Influence of Light. One batch of dishes containing malt agar was enamelled black, and another batch was left unpainted. Both were inoculated, put opposite a window, and left for 32 days. Measurements then showed that the average diameter of the colonies developed in the light was 70 mm.; that of colonies developed in the dark was 45 mm.; the perithecia developed in the illuminated colonies were rather scattered, whereas those developed in darkness were decidedly crowded.

It follows that light favours mycelial growth, whilst darkness retards it. The number of perithecia per unit area is larger in cultures grown in darkness than in cultures exposed to light.

6. Influence of atmospheric humidity. Six large crystallising dishes were sterilised and provided with a range of aqueous solutions of calcium chloride, giving the following atmospheric humidities at 20° C.: 100%, 96%, 90%, 80%, 70%, and 60% (4).

Twelve small Petri dishes containing malt agar were inoculated with Penicillium egyptiacum, and two of these were stuck upside down to the lid of each crystallising dish; their lids were removed, so that the medium was freely exposed to the moist atmosphere of the larger dish.

So far as possible, the crystallising dishes were made air tight by packing cotton wool into the spaces between their lids and bottoms.

After the colonies had grown for 10 days at 20° C, it was found that abundant moisture favours both vegetative growth and the development

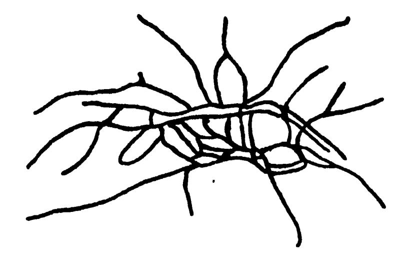


Fig. 3. Perithecial knot. × 250.

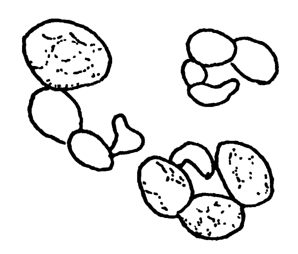


Fig. 4. Stages in the development of the ascus (from fresh squeezed perithecia). × 1000.

of perithecia. When humidity was low, vegetative growth is scanty, conidia form to some extent but perithecia are not produced. These observations are in agreement with those made by Blochwitz (2) on Aspergillus.



Fig. 5. Protrusions at hyphae tips. × 160.

III. The Morphology of Penicillium egyptiacum. On most substrata the mycelium forms dense, compact, white mats, as well as aerial wefts which interwine to form strands of hyphae bearing the conidiophores. The pericillus is monverticillate or asymmetrically biverticillate. Anastomoses are frequent, especially between the hyphae of the aerial strands. The segments of the mycelium, the conidiophores, the metulae, the sterigmata, and the conidia are all multinucleate. At germination the conidium swells and puts one or more germ tubes.

As the fungus develops knots of hyphae may be seen by the aid of a strong hand lens on the superficial mycelium; these are the primordia of perithecia (Fig. 3). In them, the ascogenous hyphae may be distinguished since they are rather stouter than the vegetative hyphae. Later, each knot

becomes very dense, and the ascogenous hyphae together with some vegetative hyphae are enclosed within a pseudoparenchymatous wall, which, when mature, is 4—6 layers thick.

Sections of material embedded in paraffin show that ascogenous hyphae become divided by septa into compartments, multinucleate and rich in contents. They give off short hyphae which curve somewhat, become septate, and the terminal cell together with one or more of the cells immediately beneath it, swell up, each yielding an ascus (Fig. 4). That is, the asci are found in chains as Emmons (3) also found. The first stages of the formation of the ascus are easily observed when fresh, well formed perithecia are gently crushed under the cover glass.

Mature perithecia are usually spherical, but they may be ovoid or pyriform. The asci are spherical in shape, and each contains 8 barrel-shaped ascospores. Each ascospore has a thin inner wall and a smooth outer one with a longitudinal furrow bordered by 2 more or less prominent margins. When the ascospore germinates it gives rise to one or two germ tubes opposite the furrow.

In old perithecia, the ascogenous hyphae, the nutritive cells and the walls of the asci are absorbed, leaving the ascospores free within the perithecial wall. This ultimately decays, liberating the spores.

Some hyphae bear terminally or subterminally curious swollen objects of problematical nature (Fig. 5); these may be seen in living cultures. The significance of the objects is at present obscure, but it is possible that they are nothing more than protrusions of the contents of the hyphae, due to the development of excessive turgor with subsequent rupture of the growing apex.

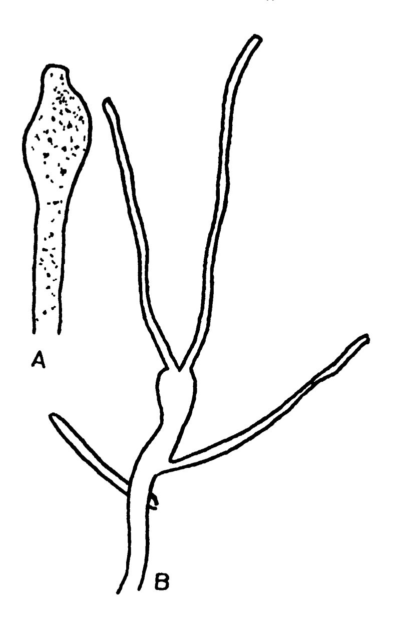


Fig. 6. Proliferating conidiophores A × 1000. B × 500.

The tips of some hyphae become rich in contents, swell somewhat, but are not delimited by a septum from the unswollen hyphae below. The swollen region then puts out one or more processes which rapidly form hyphae, and, at the same time, similar hyphae develop from just below the swelling (Fig. 6). These branch systems may be purely vegetative in character, and are possibly comparable with the proliferating conidiophores that are not uncommon in cultures of Aspergillus grown under very humid conditions.

The flattened strands of hyphae so frequently observed in culture play no part in the formation of perithecia, but they seem to be the usual foundation on which the conidiophores are produced.

Perithecia have been obtained in culture started from single conidium, single ascospore and from hyphae tips; it is evident that Penicillium egyptiacum is homophthallic.

A detailed study of the morphology and cytology of Penicillium egyptiacum is in course of preparation; it will be presented sub-

sequently. The ease with which the species may be grown, and the readiness with which it forms all stages in life history, indicate that P. egyptiacum is a very suitable fungus for class work.

The writer acknowledges the valuable suggestions of Professor Joh. Westerdijk in preparing the manuscript, and offers his thanks to Dr. B. Barnes for advice.

Summary.

The cultural characters of Penicillium egyptiacum on different media are described. The influences of temperature, pH, reduced pressure, light, and humidity are given.

The morphology is briefly described.

The fungus gives rise to superficial knots of hyphae from which perithecia are developed. Ascogenous hyphae give rise to asci each with 8 ascospores. The fungus is homothallic.

The mycelium, conidiophores, metulae, sterigmata, conidia, and ascogenous hyphae are all multi-nucleate.

Literature cited.

1. van Beyma, F. H., Beschreibung einiger neuer Pilzarten aus dem Centraalbureau voor Schimmelcultures. (Zentralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. 88. 1933. S. 132—141.) — 2. Blochwitz, A., Perithezien, Sklerotien und Eidamsche Blasen der Aspergillaceen. (Beihefte zum Botanischen Centralbl. Bd. 49. 1932. Abt. 1. S. 262—292.) — 3. Emmons, C. W., The ascocarps in species of Penicillium. (Mycologia. Vol. 27. 1935. No. 2. p. 128—150.) — 4. Landolt-Bornstein, Physikalisch-chemische Tabellen. Berlin. — 5. Sabet, Y. S., A Preliminary Study of the Egyptian Soil Fungi. (Bull. of the Faculty of Science. No. 5. p. 1—29.)

Morphological and Physiological Studies upon a Penicillium sp. Tolerant to Saturated Copper Sulfate.

[Fruit Products Laboratory, University of California, Berkeley.]

By **Clifford L. Bedford.**

With 3 figures in the text.

It is generally believed that most fungi are sensitive to low concentrations of copper sulfate. Prevost (20) observed that smut spores failed to germinate after exposure to a 1 : 400,000 copper sulfate solution. Nägeli (20) found that Spirogyra cells were killed when exposed to a copper sulfate solution of 1 : 1,000,000,000. It has also been reported that a small quantity of copper in nutrient solutions is toxic to the roots of higher plants, Tschirch (20). Lipman and Mackinney (10) however have shown that copper is necessary for the growth of wheat plants. Coupin (2) raised grain in water cultures containing various copper salts. Toxicities varied in the following order of decreasing toxicity $Cu\,Cl_2$, $Cu\,Br_2$, $Cu\,NO_3$, $Cu\,Ac_2$, $Cu\,SO_4$.

Trabut (24) described P. cupricum as a species of Penicillium which grew in relatively high concentrations of copper sulfate. De Seynes (3) however maintained Trabut's species was P. glau-

cum. Gueguen (6) found that P. glaucum grew in a 1 : 200 copper sulfate solution. Hattori (7) reported an .008 per cent solution of copper sulfate to act as a growth stimulant. Bortels (1) believed copper essential for pigment formation in the conidia of A. niger. Roberg (19) observed that the mycelium of A. niger contained copper. Schwartz and Steinhart (21) found that A. niger absorbed copper from a nutrient solution.

According to Villedieu, M. and Mme. (26) most ordinary molds may be cultivated in nutrient solution containing up to 10 per cent cupro-ammonium citrate which contains 15 per cent copper. They further stated that Penicillium grows well in agar saturated with this salt. They attributed the toxicity of copper sulfate to the free sulfuric acid produced by the solution of copper sulfate. The findings of the writer are at variance with this conclusion. Faes and Staehlin (5) gave the order of toxicity of various cations to a number of fungi as follows in order of decreasing toxicity: Ni, Cu, Zn, Fe, Al. Talts (23) has given the following order for P. glaucum in order of decreasing toxicity: Cd, Co, Zn, Ni.

Other investigators who have contributed to the effect of heavy metals and their salts are Mokragnatz (13), Yoshiji (28), Molliard (15), Moll (14), Kaho (8), Paul and Kronig (16), Steinberg (22), Porges (17), Eisenberg (4) and McHargue and Calfee (11).

The writer has recently obtained a Penicillium sp. which grows vegetatively but does not sporulate in saturated (20 per cent) copper sulfate solution. Because of its unusual tolerance to copper some of the morphological and physiological characteristics of this fungus have been studied. The results obtained are briefly described below.

General Morphology.

The procedures used in conducting the morphological studies were those given by Thom (25). The color observations are in accordance to those of Ridgway (18). Observations were taken on cultures between 3 and 12 days of age.

On potato dextrose agar (pH 5.6—6.7): Colonies velvety, nonzonate spreading slowly with no definite margin, 500—1000 μ deep. Conidial area colored Puritan grey with reverse side aniline or honey yellow. No production of drops; odor absent. Conidiophores rise from submerged hyphae. Conidia in long tangled chains.

On modified Czapek's agar (pH 3.5—4.0): Similar to proceeding except conidial area colored light drab, reverse side dark olive buff.

On potato dextrose peptone (pH 6.7): Colonies spread rapidly, conidial area colored tea green or mineral grey, reverse side strontian yellow.

In the presence of copper sulfate the conidial area is colored white at high concentrations and light drab at lower concentrations, reverse side covered by crystals of copper sulfate. The colonies are deeply wrinkled.

In liquid medium the surface film shows characteristics similar to those previously mentioned. In lower concentrations of copper sulfate (2 per cent and less) growth is similar to that described above, but as the concentration of copper increases the growth becomes distributed between the surface and the depths of the culture solution. Hyphae growth is increased and spore production is decreased. Color is absent. At still higher concentrations (4 per cent and above) the growth is distributed throughout the

culture solution and in many cases surface growth is entirely lacking and thus spore production is inhibited.

Microscopic Morphology.

Microscopic observations were made on cultures grown on potato dextrose agar. Appearance is similar to that observed for cultures taken from other media.

Hyphae: Older hyphae with thickened cell walls; few vacuoles, septa numerous. Protoplasm slightly granular. Young hyphae similar to older hyphae but lack vacuoles and septa.

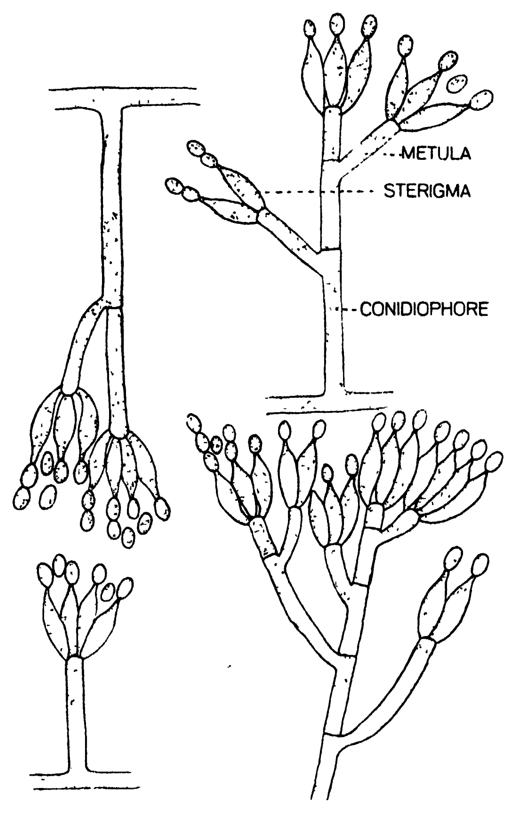


Fig. 1. Typical types of conidial apparatus.

Conidiophores: Produced upright on submerged hyphae. They appear to have granulated walls. Length 80—300 μ and diameter 2.5—3.5 μ. Branching asymmetric.

Penicillia: Indefinite with variation in number of sterigmata and metulae. Total length without spores 25—35 μ.

Metulae: 0—5 in number, 15—18 μ long, 2.5—3.5 μ in diameter.

Sterigmata: 1—4 in number, 7.5—8.5 μ long, 2.5—3.5 μ in diameter, forms a narrow apex which swells at the tip with conidia production.

Conidial chains: Divergent, tangled and not in definite upright columns. Indefinite in length.

Conidial chains: Divergent, tangled and not in definite upright columns. Indefinite in length.

Conidia: Hyaline 4.0—4.5 μ by 2.0—2.5 μ and smooth.

Conidial germination: Germinate with emergence of germ tube, place of emergence indefinite, apparently no noticeable swelling.

In the presence of copper sulfate the older hyphae show a great distortion increasing with increase of copper concentration. The protoplasm is very dense and not granular. The young hyphae show no distortion but the protoplasm is dense in appearance.

Sketches of the structures described above are shown in Fig. 1 and 2.

Classification: Using Thom's (25) key this organism may be classified definitely as a species of Penicillium in the asymmetrica-velutina group. Further classification has been attempted but without success.

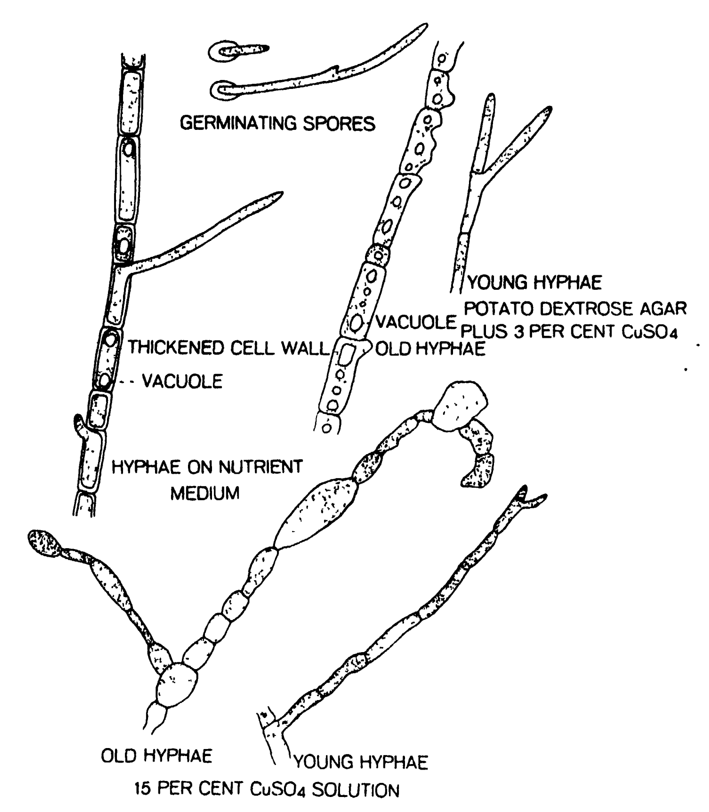


Fig. 2. Germinating spores, hyphae on nutrient medium, in the presence and absence of $CuSO_4$ and in the presence of a 15 per cent $CuSO_4$ solution.

Physiological Investigations.

Literature concerning the physiology of Penicillia has been summarized by Thom (25), Talts (23), Webb (27), and Zeller, Schmitz and Duggar (29), however in no case was a Penicillium sp. tolerant to saturated copper sulfate considered.

The cultures were grown in 50 cc. of sterilized modified Czapek's liquid medium containing acid phosphate. Inoculations were made from spore suspensions in water, 0.2 cc. being used for each inoculation. The spores for inoculation were obtained from 3—4 week old agar slants in order to obtain mature spores. The cultures were all grown at 25—27° C. which was found to be the optimum temperature. The dry weight of the mycelium was determined by collecting in Gooch crucibles on an asbestos mat and drying at 70° C. under 28 inches vacuum for 16 hours. Only C. P. salts were used.

Comparison of the Utilization of Carbon from Various Sources.

Carbohydrates: The compounds used were dextrose, maltose, lactose, sucrose and starch. Ten per cent concentrations were used in Czapek's medium. Observations on growth were made after 8 and 14 days. The variation in growth was slight on the various sugar and starch solutions. This finding agrees with results obtained by Küster (9).

Experiments were then conducted to determine first, the effect of various concentrations of dextrose on the amount of sugar transformed; second, the rate of dextrose transformation; third, the rate of inversion

and utilization of sucrose, and fourth, the rate of inversion of starch. The carbohydrates were added to Czapek's medium in the concentrations desired. The results are given in the following tables:

Table 1. Effect of Dextrose Concentration on Amount Utilized in Two Weeks.

Mg. Dextrose per cc.			Per cent Decomposition	Acidity in cc. N/10 NaOH per 10 cc.
Original	Residual	Difference		
44.2	6.0	38.2	86.4	0.62
87.3	22.6	64.7	74.1	8.15
129.3	33.0	96.3	75.5	25.50
261.0	141.0	120.0	45.9	31.50
307.4	196.0	112.4	35.7	15.00
392.6	225.0	167.6	42.9	5.50

Table 2. Rate of Decomposition of 10 per cent Dextrose.

Time (days)	Mg. Dextrose remaining per cc.	Per cent Decomposition	Acidity in cc. N/10 NaOH per 10 cc.
5	59.6	40.4	0.52
10	41.2	58.8	0.74
18	35.1	64.3	5.81
25	30.0	70.0	9.64
32	9.5	90.5	11.36
39	4.0	96.0	6.25
44	2.4	97.8	3.00
Blank	100.0	—	—

Table 3. Rate of Sucrose Inversion.

Time (days)	Mg. invert sugar per cc.			Per cent Inversion
	After Inverting	Before Inverting	Difference	
5	181.24	30.0	151.24	38.0
10	157.00	90.9	66.10	67.0
18	162.00	118.0	44.0	78.2
25	170.00	140.0	30.0	85.0
32	166.00	157.0	9.0	96.0
Blank	200.00	—	—	—

In table 1 the results show that with an increase in concentration of dextrose the percentage of decomposition decreases although the total amount of dextrose utilized was greater at the higher concentrations. The acid formed increases up to a concentration of 25 per cent dextrose. Above this concentration of dextrose acid formation was less. Table 2 shows a close correlation between acidity and decreased in amount of dextrose present. The acidity increased until the amount of dextrose left was small and then the acidity decreased, indicating the utilization of acid as a source of carbon after sugar utilization. Table 3 shows that an increasing proportion of the sucrose was converted into invert sugar with time. As the initial

concentration of sucrose was high the amount utilized was small in comparison to the amount present.

The starch solution became gelatinized through sterilization and thus was a solid medium at the time of inoculation. After two weeks growth the starch was completely liquified, showing that hydrolysis had occurred. The amount of invert sugar formed averaged 2 per cent per week as shown by analysis made once a week.

Organic Acids as Sources of Carbon: In the first experiment growth and changes in pH value and acidity in a culture medium containing an organic acid as the sole source of carbon were determined. Acetic, lactic, tartaric and citric acids in 1 per cent solutions were used. The results of growth in tartaric and citric acids are presented in table 4. Growth in acetic and lactic acids was very slight and hence no data is presented.

In the second experiment solutions containing 1 per cent tartaric and citric acids respectively and 10 per cent dextrose as carbon source were used. Growth was observed over a period of 6 weeks. The results are presented in table 5.

Table 4. Growth with 1 per cent Tartaric acid and 1 per cent Citric acid Solutions.

Time (days)	Gm. Mycelium Dry Wt.		pH		Acidity in cc. n/10 NaOH per 10 cc.	
	Tartaric	Citric	Tartaric	Citric	Tartaric	Citric
20	.0180	.0143	3.4	2.8	2.0	5.52
27	.0784	.0645	4.3	3.2	1.25	2.02
34	.0861	.0760	4.9	4.3	0.90	1.25
41	.0963	.0834	7.1	7.1	0.10	0.19
Blank	—	—	3.2	2.3	16.00	17.30

Table 5. Growth with 1 per cent Tartaric Acid and 1 per cent Citric acid Solutions with 10 per cent Dextrose.

Time Days	Gm. Mycelium Dry Wt.		Residual Sugar Gm. per 100 cc.		pH		Acidity in c.c. n/10 NaOH per 10 cc.	
	Tartaric	Citric	Tartaric	Citric	Tartaric	Citric	Tartaric	Citric
14	.9593	.5269	4.080	5.850	3.5	2.8	—	—
21	1.5945	1.1080	1.300	2.400	3.5	3.1	12.74	22.76
28	1.6230	1.2030	0.290	1.980	3.7	3.0	9.50	23.70
35	1.6730	1.3378	0.077	0.330	5.3	3.0	1.00	22.90
42	1.7070	1.3170	0.036	0.095	7.0	3.6	0.60	13.50
49	1.6470	1.3420	0.040	0.040	7.5	5.4	0.35	0.90
Blank	—	—	10.000	10.000	3.1	2.3	19.10	18.40

Comparison of Various Sources of Nitrogen.

The method used for comparison of different nitrogen sources was similar to that of Talts (23). Various nitrogen containing compounds were added to Czapek's medium and the amount of growth determined after two weeks. The results are presented in table 6.

Table 6. Relation of Nitrogen Source to Growth.
(Growth expressed as dry weight of Mycelium.)

Salt	.05%			0.1%			0.3%		
	Dry Wt. Gms.	pH Before	pH After	Dry Wt. Gms.	pH Before	pH After	Dry Wt. Gms.	pH Before	pH After
$(NH_4)_2SO_4$ . .	.3244	4.1	2.4	.3629	4.2	2.3	.3342	4.3	2.2
NH_4NO_3 . .	.2494	4.0	3.4	.2874	4.3	2.2	.1981	4.3	2.3
NH_4 citrate .	.4970	4.5	3.0	.4574	4.8	3.0	.4378	5.0	3.3
NH_4 tartarate	.4818	5.2	2.8	.4354	5.4	3.2	.4278	5.4	3.3
Glycine . . .	.3970	—	—	.5784	—	—	.5482	—	—
Casein . . .	.0952	—	—	.1209	—	—	.1934	—	—
$NaNO_3$ . . .	.2371	3.8	6.6	.2312	4.0	5.6	.2146	4.2	5.0

These results are in general agreement with those of Talts (23) and others who found that the ammonium salts of organic acids are preferable to inorganic ammonium salts for maximum growth. In the media containing the ammonium salts a shift to the acid range is observed. This increased acidity has led many to use potassium or sodium nitrate, but as Webb (27) has shown the optimum germination and growth occurs in an acid medium and thus the change of pH is probably of secondary importance.

Growth in the Presence of Copper Sulfate.

The Penicillium sp. under study was found growing in Fehling's copper sulfate solution used for sugar determinations in which the copper concentration is 1.64 per cent as metallic copper.

Since this fungus shows such striking resistance to copper sulfate, the following factors were studied: first, the effect of pH and copper concentrations on growth in nutrient media and second, the determination of copper in the mycelium after growth in copper sulfate solutions of various concentrations. In the experiment on copper absorption, the relation of the culture to the amount of copper in the mycelial ash; second, the relation of concentration of copper in the solution to the copper in the mycelial ash; and third, the effect of various washing treatments on the amount of copper in the mycelial ash were studied.

Various concentrations of copper sulfate in Czapek's liquid medium were used varying from 0 to 80,000 ppm. of metallic copper. Since sterilization of the medium by heat in the presence of copper salts involves possible chemical changes with sugar it was necessary that the copper salt be added asceptically after sterilization. At the lower concentration this was accomplished by adding the proper amount of copper sulfate from a sterilized standard solution by means of sterile pipettes, taking the dilution factor into consideration. This method was not applicable to the higher concentrations, owing to dilutions that would occur in the nutrient medium. Therefore, the desired concentrations were obtained by adding the amounts of cupper sulfate salt to the sterilized nutrient medium as aseptically as possible. In numerous blank solutions made up in this manner, there were no contaminations and therefore the method was considered to be satisfactory.

The pH of the medium was adjusted with HCl and NaOH before sterilization and redetermined by the quinhydrone electrode after sterilization and after the addition of copper sulfate.

The determinations of copper were made both on the resulting nutrient medium and the mycelial ash by the A .O. A. C. method (12).

In order to conserve space the experimental results of the first experiments, i. e., on the effect of pH and copper sulfate concentration will not be given, but suffice it to say that pH played a very minor role in affecting growth in the acid range (pH 2.5 to 6.5) either in the presence or absence of copper sulfate. At pH values of about 6.5 there was a retardation of growth and in the alkaline range no growth was obtained in the presence of copper sulfate.

A retardation of growth was observed in the presence of high concentrations of copper sulfate, i. e., about 1600 p. p. m. during the initial period of growth, but this retardation was caused by high copper concentration rather than by low pH value as it was the same at all pH values. These results are in agreement with those of Talts (23).

The results from the experiments on the absorption of copper by the mycelium are shown in figure 3.

It is evident that only in the lower concentration of copper in the external medium was there any effect of copper concentration on the ratio of copper in the mycelial ash to the dry mycelial weight. Whereas at the higher concentrations, above 1600 to 2000 p. p. m. of copper the ratio was relatively constant and independent of external copper concentration.

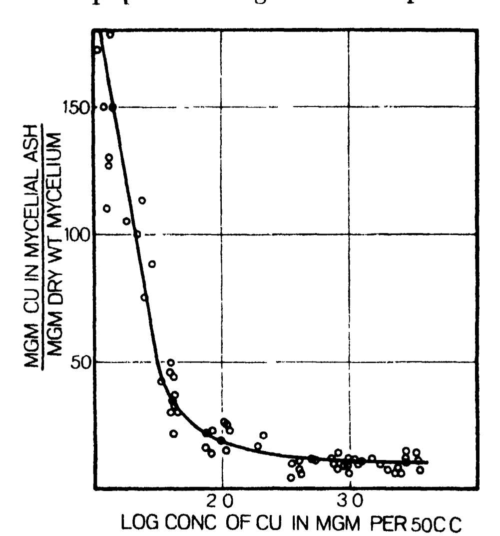


Fig. 3. Relation of copper concentration to the amount of copper present in the mycelial ash.

The age of the culture and the various washing treatments had very little effect on the ratio of copper in the mycelial ash to the dry weight of mycelium. The mycelium was washed experimentally with water solutions of HNO_3, HCl, HAc, and H_2SO_4 (0.1 to 5.0 N), and with ether without removing appreciable amounts of copper.

Effect of Other Copper Salts on Growth: The copper salts used, other than copper sulfate, were chloride, nitrate, and acetate. The various concentrations were obtained as previously described for copper sulfate. The results from these experiments showed that each of these salts had a toxic limit for the organism. With copper acetate it was between 800 to 1600 p. p. m. of copper, for copper chloride, between 4800 to 6000 p. p. m. of copper, and for copper nitrate, between 9000 to 10,000 p. p. m. of copper. Thus not only the cation but also the anion played a very important role in determining the toxicity of copper salt to this organism.

In determining the ratio of copper in mycelial ash to dry weight of mycelium results similar to those with copper sulfate were obtained.

Effect of Other Heavy Metal Salts on Growth: Other heavy metal salts used were: $NiCl_2 \cdot 6\,H_2O$, $Co(NO_3)_2 \cdot 6\,H_2O$, $CdCl_2 \cdot 2\,H_2O$, $MnCl_2 \cdot 4\,H_2O$, $ZnSO_3 \cdot 7\,H_2O$, $FeSO_3 \cdot 7\,H_2O$, $PbNO_3$, $HgCl_2$,

and $AgNO_3$. With the exception of the last three salts, the various concentrations of the heavy metals in the nutrient medium were obtained as previously described for copper. For the last three the toxic concentrations were determined by mixing a measured volume of the spore suspension will an equal volume of salt solution and allowing to stand for 10 minutes, the suspension was then planted on nutrient agar to determine whether or not the spores had been killed. The toxic concentrations for the other heavy metals were check in a similar manner.

The toxic limits were found to be as follows:

Hg	between	40	and	70	p.p.m.
Ag	,,	250	,,	280	,,
Co	,,	1600	,,	1800	,,
Ni	,,	1968	,,	2460	,,
Pb	,,	2500	,,	2800	,,
Cd	,,	24,000	,,	25,000	,,
Fe, Mn, Zn	above 30,000 p.p.m. The toxic concentration was not obtained.				

The effect of the various anions on the above cations was not determined. The sequence of toxicity does not agree with that of other investigators, but, as will be seen in the next section, in accordance with Faes and Staehlin (5), Moll (14), and Kaho (8), it was found that the sequence and the toxic concentrations of the individual metals varies greatly with the organism studied. Therefore, such variations can be expected.

Effect of Copper Sulfate and Other Heavy Metal Salts on Growth of Related Species: The organisms used were *Aspergillus niger*, *P. oxalicum*, and *P. expansum*. The salts used were $CuSO_4$, $7\ H_2O$, $NiCl_2 \cdot 6\ H_2O$, $Co(NO_3)_2 \cdot 6\ H_2O$, $CdCl_2 \cdot 2\ H_2O$, and $Zn\ SO_4 \cdot 7\ H_2O$.

Determination of the toxic concentrations was made as previously described. The toxic limits were found to be as follows:

		A. niger			P. oxalicum and P. expansum				
Ni	between	1400	and	1500	1400	and	1500	p.p.m.	
Co	,,	1500	,,	1600	1500	,,	1600	,,	
Cu	,,	1500	,,	1600	60	,,	100	,,	(P. expansum)
					300	,,	400	,,	(P. oxalicum)
Cd	,,	4800	,,	4900	4800	,,	4900	,,	
Zn	,,	30,000	— no toxic limit reached		4800	,,	4900	,,	

Comparing the above results with those obtained with the copper tolerant *Penicillium* it may be seen that the tolerance of the above three species is in every case lower than for the copper tolerant species. This is particularly true for Cd, whereas with Co and Ni the difference is not so great.

Summary.

1. A *Penicillium* species capable of growing in saturated copper sulfate solution has been studied morphologically and physiologically.

2. Morphological investigations show that the organism reported upon in this paper is a *Penicillium* sp. in the asymmetric-velutina group.

3. Growth in the presence of copper sulfate caused the protoplasm of the hyphae to change from granular to dense. Higher concentrations caused distortion of the hyphae.

4. The organism utilized sucrose, dextrose, maltose, lactose, and starch very readily and acetic, lactic, citric, and tartaric acids with difficulty. Organic acids were used as a source of carbon after the sugars had been utilized.

5. The most suitable nitrogen sources were the ammonium salts of the organic acids.

6. Growth occurred at all concentrations of copper sulfate.

7. The optimum pH range was found to be between pH 2.5 and 6.5.

8. The amount of copper in the ash was found to depend on the concentration of copper in the external solution at the lower concentrations, but was independent of the copper concentration of the medium at higher concentrations.

9. The copper was firmly fixed in the mycelium and could not be removed by leaching with water, dilute acids, or ether.

10. There was no constant proportionality between the length of the incubation period and the amount of copper absorbed.

11. Other copper salts exhibited toxic concentrations below saturation. Toxicity appeared to depend upon the anions. The following order of decreasing toxicity was found for the anions: Ac, Cl, NO_3. The order of toxicity of these three ions is contrary to that which one would expect if it depended upon the pH effect of increasing acidity.

12. The effect of other heavy metal cations gave the following order of decreasing toxicity: Hg, Ag, Co, Ni, Pb, Cd, Fe, Mn, Zn.

13. The effect of heavy metal cations on A. niger, P. expansum and P. oxalicum occurred in the following decreasing orders of toxicity: Penicillium species: Cu, Ni, Co, Cd, Zn, Aspergillus sp.: Ni, Cu, Co, Cd.

Acknowledgments.

The author desires to express his thanks to Drs. W. V. Cruess, J. T. Barrett, and Lee Bonar, and also to E. M. Mrak for their assistance and suggestions in this investigation, and is greatly indebted to M. L. Sherrill of the California-Hawaiian Sugar Corporation, from whom the orginal culture was obtained.

Literature Cited.

1. Bortels, H., Significance of Fe, Zn, Cu for microorganisms. (Biochem. Ztschr. Bd. 182. 1927. S. 301.) — 2. Coupin, H., Compt. Rend. Acad. Sc. T. 132. 1907. p. 1582. — 3. Seynes, J. de, Résultats de la culture du Penicillium cupricum Trabut. (Bull. Soc. Botan. France. T. 42. 1895. p. 451—455, 482—485.) — 4. Eisenberg, P., Versuche über spezifische Desinfektionsvorgänge. Über die Wirkung von Salzen und Ionen auf Bakterien. (Centralbl. f. Bakt., Orig. Bd. 82. 1919. S. 69.) — 5. Faes, H., and Staehlin, M., Action cryptogramicide comparée des sels de cuivre, de nickel, de zinc, de fer et d'aluminium sur divers champignons parasites. (Vaud. Sci. Nat. Mem. Soc. T. 2. 1925. p. 73—139.) — 6. Gueguen, F., Recherches sur les organismes mycéliens des solutions pharmaceutiques. Etudes biologiques sur la „Penicillium glaucum". (Bull. Soc. Mycol. France. T. 14. 1899. p. 201—255; T. 15. p. 22.) — 7. Hattori, H., Studien über die Einwirkung des $CuSO_4$ auf einige Pflanzen. (Abd. a. d. Journ. of Coll. Sci. Imp. Univ. Tokyo. Vol. 15. 1901. p. 371—394.) — 8. Kaho, H., Toxic reaction of heavy metal salts to plant protoplasm. (Biochem. Ztschr. Bd. 122. 1921. S. 39—42.) — 9. Küster, L., Kultur der Mikroorganismen. Leipzig 1921. — 10. Lipman, C. B., and Mackinney, G., Proof of the essential nature of copper for higher green plants. (Pl. Physiol. Vol. 6. 1931. p. 693—599.) — 11. McHargue, J. S., and Calfee, R. K., Effect of Mn, Cu, and Zn on growth of A. flavus and Rhizopus nigricans. (Bot. Gaz. Vol. 91. 1931. p. 183.) — 12. Methods of Analysis. Association of Official Agr. Chemists. Third Ed. Washington, D. C. 1930. — 13. Mokragnatz, M., Action of Ni and Co on development of A. niger. (Chim. Biol. Bull. Soc. Vol. 13. 1931. p. 61—71.) — 14. Moll, F., Toxic action of inorganic salts on fungis. (Centralbl. f. Bakt. Bd. 51. 1920. S. 257—289.) — 15. Molliard, M., Influence of Cu salts

on yield of Sterigmatocystis niger. (Compt. Rend. T. 175. 1922. p. 838—841.) — 16. Paul, T., and Kronig, B., Desinfektion and Dissoziation. (Ztschr. f. Physik-Chemie. Bd. 21. 1896. S. 1753.) — 17. Porges, N., Chemical composition of A. niger as modified by $ZnSO_4$. (Bot. Gaz. Vol. 94. 1932. p. 197—205.) — 18. Ridgway, R., Color standards and color nomenclature. Washington, C. D. 1912. — 19. Roberg, M., Further observations of the effect of Zn, Fe, and Cu on A. niger. (Zentralbl. f. Bakt., Abt. II. Bd. 84. 1931. S. 196—230.) — 20. Schander, R., Über die physiologische Wirkung der Kupfervitriolkalkkrume. (Land. Jahr. Br. Bd. 33. Heft 4/5. 1910.) — 21. Schwartz, W., and Steinhart, H., Oligodynamic action of Cu on A. niger (trans. title). (Arch. Mikrobiologie. Vol. 2. 1931. p. 361.) — 22. Steinberg, R. A., A study of some factors in the chemical stimulation of growth of A. niger. (Amer. Journ. Bot. Vol. 6. 1919. p. 330.) — Effects of Zn and Fe compared with Ur and Cu on growth of A. niger. (Bot. Gaz. Vol. 70. 1920. p. 465—468.) — 23. Talts, J., Einfluß der Schwermetallsalze auf P. glaucum. (Protoplasma. Bd. 15. 1932. S. 188—238.) — 24. Trabut, L., Sur un Penicillium végétant dans des sols concentrees de sulfat cuivre. (Bull. Soc. Bot. France. T. 42. 1895. p. 451—455.) — 25. Thom, C., The Penicillia. Baltimore (Williams and Williams) 1930. — 26. Villedieu, M. and Mme., Non-toxicity of Cu for molds in general and for mildews in particular. (Compt. Rend. Acad. Sci. Paris. T. 171. 1920. p. 737—739.) — 27. Webb, R. W., Germination of spores of certain fungi in relation to pH. (Ann. Mo. Bot. Gard. Vol. 6. 1919. p. 201—221; Vol. 8. p. 283—340.) — 28. Yoshiji, Y., Effect of Al on molds. (Sci. Rpts. Tohoku Impt. Univ. Vol. 3. 1927. p. 547.) — 29. Zeller, S. M., Schmitz, H., and Duggar, B. M., Growth of wood destroying fungi on liquid media. (Ann. Mo. Bot. Gard. Vol. 6. 1919. p. 137.)

Untersuchungen über die systematische Stellung und die Physiologie des Kellerschimmels Rhacodium cellare Persoon.

[Aus der Pflanzenphysiologischen Versuchsstation der Versuchs- und Forschungsanstalt für Wein-, Obst- und Gartenbau in Geisenheim a. Rh.]

Von **Hugo Schanderl.**

Mit 8 Abbildungen im Text.

Die systematische Stellung des in den Weinkellern Europas und Amerikas wohlbekannten Pilzes Rhacodium cellare Pers.[1]) ist nicht genau bekannt, ja in vielen systematischen Werken oder ähnlichen Schriften steht er noch bei den Pilzen mit sterilen Myzelien, trotzdem Guéguen 1906 seine Konidien nachgewiesen und beschrieben hat. So stellte ihn Lindau in Rabenhorsts Kryptogamenflora von Deutschland 1907, ebenfalls noch zu den Pilzen mit sterilen Myzelien, und Klöcker bemerkte noch 1924 in der 3. Auflage: „Die Gärungsorganismen", „Fortpflanzungsorgane sind ganz unbekannt", worauf Elssmann in seinem Sammelreferat über Rhacodium cellare 1925 bereits hinwies. Aber auch Janke führte noch 1924 in „Allgemeine technische Mikrobiologie, I. Teil, Mikroorganismen" den Kellerschimmel im Anhang bei den Pilzen mit sterilen Myzelien auf. Nur R. Meißner ist die Arbeit von Guéguen nicht entgangen; er gab in seiner „Technischen Betriebskontrolle im Weinfach" sogar eine Zeichnung eines Konidienstandes nach Guéguen wieder, worauf wir später noch zurückkommen werden.

[1]) Der Name kommt vom griechischen ῥάκος = Lumpen, Fetzen, und εἶδος = die Gestalt, Ähnlichkeit, also Lappenpilz. Die Schreibweise „Racodium", welche man ebenfalls häufig findet, übersieht den spiritus asper.

Eine Durchmusterung der Literatur nach Arbeiten über Rhacodium cellare ergab jedenfalls, daß solche außerordentlich spärlich sind. Man kann ruhig sagen, daß die Arbeit von Guéguen die einzige ist, welche einige Fortschritte in der Kenntnis der systematischen Stellung und Physiologie dieses Kellerschimmels brachte. Guéguen verwies Rhacodium cellare in die Familie der Dematiaceae. Hiermit war wenigstens die große Richtung gewiesen, in der dieser Pilz in das System der Pilze einzureihen ist.

Das Ziel dieser Arbeit war zunächst in der von Guéguen gezeigten Richtung weiterzugehen, um evtl. die engere Zugehörigkeit von Rhacodium cellare zu einer Abteilung, Unterabteilung und Gattung innerhalb der Familie der Dematiaceae festzustellen. Weiterhin sollte die bisher ungeklärte Frage beantwortet werden, wovon der Pilz an den Wänden der Weinkeller eigentlich lebt.

Untersuchungen über die systematische Stellung des Kellerpilzes Rhacodium cellare.

Zunächst war hierzu nötig, den Pilz in Reinkultur zu nehmen. Dies erwies sich als sehr schwierig, da die Myzelien aus den verschiedenen Weinkellern alle mit Sporen von Penicillium glaucum, Aspergillus-Arten, Cladosporium herbarum, mit Rosahefen und Bakterien stark verunreinigt sind, auf den üblichen Nährböden die genannten Organismen, insbesondere Penicillium-Arten bedeutend schneller wachsen als Rhacodium cellare. Die zahlreichen mit Myzel aus Weinkellern angelegten Ausgangskulturen wurden so schnell von den genannten Organismen überwuchert, daß dieser Weg zur Gewinnung einer Reinkultur völlig aussichtslos erschien. Diese Schwierigkeiten sind wahrscheinlich auch schuld daran, daß über den Kellerschimmel bisher so wenig Untersuchungen vorliegen. Schließlich war aber ein anderer Weg erfolgreich. Es wurden aus alten Myzelpolstern Sklerotien herauspräpariert, oberflächlich mit sterilem Wasser gewaschen und sodann in sterilem Wasser mit Nadeln zerdrückt und zerstückelt. Die Sklerotien bestehen aus dicht verflochtenen Knäueln ganz kurzzelligen Myzels. Aus der so erhaltenen Aufschwemmung sehr kleiner Myzelstücke gelang es eine Reihe Reinkulturen herzustellen, die sich im Laufe der Zeit immer besser an die Malzagar- oder Malzgelatineböden gewöhnten. Hiermit war die Grundlage zur eigentlichen Arbeit geschaffen.

Das Wachstum von Rhacodium cellare auf festen Nährböden.

Die Entwicklung der Kolonien auf Malzagar oder Mostgelatine geht im Verhältnis zu anderen Pilzen langsam vor sich. Der Pilz bildet samtartige Polster, welche in der Mitte gewölbt und an den Randzonen flach sind. Die Kolonien wachsen normalerweise gleichmäßig kreisförmig. Die Farbe der Kolonien wechselt mit dem Alter. In den ersten Tagen erscheint die Kolonie bläulich-grün wie bei Penicillium glaucum oder Aspergillus glaucus. Alsbald geht die Farbe aber in ein schönes, samtiges Dunkelolivgrün über, wie man sie in Weinkellern an jüngeren Vegetationen häufig findet. Nach 2—3 Monaten verliert sich die grüne Farbe und schlägt in einen graubraunen bis dunkelbraunen Ton um. Die dunkle, olivgrüne Färbung geht offensichtlich im Licht schneller zurück als im Dunkeln. Im Dunkeln

aufbewahrte Kulturen bleiben bedeutend länger grün als Kulturen, die im Tageslicht standen. Der äußerste Rand der Kolonien ist, wie bei Cladosporium-Arten, während des Wachstums immer weiß oder weißlich und glatt, nicht gebuchtet. Sehr wesentlich für die Beurteilung der systematischen Stellung von Rhacodium cellare ist die Färbung der Unterseite seiner Kolonien. Diese beginnt alsbald von der Mitte aus dunkel, schließlich tiefschwarz zu werden. Die dunkle Färbung reicht stets bis fast an den Rand der Kolonie. Ebenfalls also ein Merkmal, das für Cladosporium-Arten eigentümlich ist. Ein weiteres mit den Cladosporium-Arten gemeinsames Merkmal ist der hohe Gehalt an proteolytischen Enzymen. Gelatinenährböden werden in der Umgebung der Kolonie von dem Pilz vollständig verflüssigt.

Zum Vergleich wurde Cladosporium fulvum von damit befallenen Tomatenblättern in Kultur genommen; jüngere Kulturen dieses Pilzes auf Agarböden ließen sich gut von Rhacodium-Kulturen durch die Färbung unterscheiden. Die jungen Kulturen von Cladosporium fulvum waren meist fuchsbraun. Ältere Kulturen, vor allem solche auf Apfel- und Birnenschnitten, ließen sich durch die Farbe und das Aussehen der Kolonien nicht mehr von älteren Rhacodium-Kulturen unterscheiden.

Auf die große äußere Ähnlichkeit der Rhacodium-Kulturen mit denen von Cladosporium herbarum weist auch Guéguen mehrmals hin. So sagt er bei der Schilderung des Aussehens der Kulturen mit 5% Gelatine und Raulinscher Nährlosung: „cinquième jour colonies brunâtres analogues à celles du Cladosporium herbarum sur la même milieu mais plus duveteuses.“ Die starke Gelatineverflüssigung durch Rhacodium wurde ebenfalls bereits von Guéguen beobachtet.

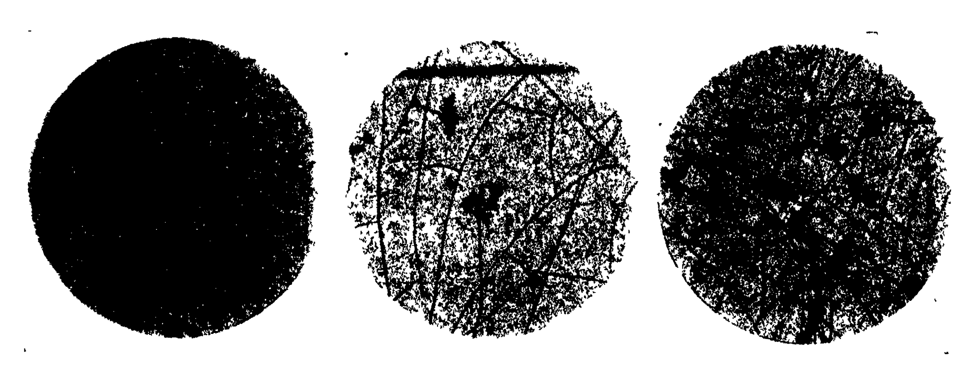


Abb. 1. Konidienstände von Rhacodium cellare Pers. (= Cladosporium cellare). Vergrößerung 100 fach.

Die Fruktifikationsorgane von Rhacodium cellare.

Auch diese hat Guéguen auf künstlichen Nährböden erzielt, beschrieben und abgebildet. Auf Malz-Agar und in verschiedenen später zu beschreibenden flüssigen Kulturen erhielt auch ich reichlich Konidienstände. Sie sind leider immer so zerbrechlich, daß man sie nicht aus den Kulturen herausholen kann, ohne daß sie völlig auseinanderfallen. Die Mikroaufnahmen konnten daher nur durch die Reagenzgläser hindurch gemacht werden. Es mußten Stellen gesucht werden, wo das Myzel an den Glaswänden hochgewachsen war und wo von der Gegenseite Licht ungehindert durchfallen

konnte Abb. 1a u. b. In Tröpfchenkulturen wurde trotz wiederholter Versuche nie Sporenbildung erzielt[1]). Die Konidienstände entstehen an aufgerichteten kurzen Hyphenästen. Diese zeigen mehrere Seitenäste (3—5); an ihnen können bereits die Sporen sitzen, vielfach aber sitzen diesen Seitenästen nach Art einer zusammengesetzten Blütendolde wieder 2—4 Seitenäste auf, welche an ihrem Ende Büschel von 3—12 und mehr Sporen tragen (Abb. 2).

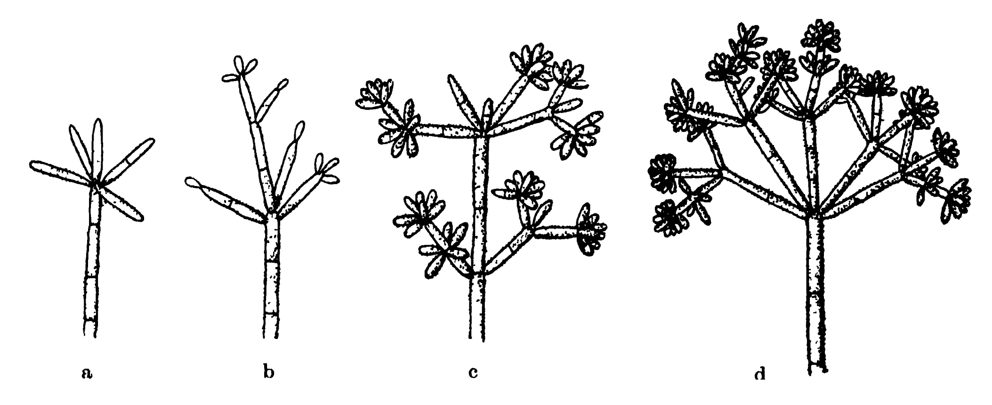


Abb. 2. a und b Die Entwicklung der Konidienstände (a noch ohne Konidiosporen), c und d 2 fertige Konidienstände.

Die Konidienstände sind nicht alle nach dem gleichen Schema gebaut. Zwischen den Formen, die man als zusammengesetzte Dolde, andere, die man als Pleiochasium ansprechen könnte, gibt es allerlei Varianten. Die meisten von Guéguen abgebildeten Sporenstände (Abb. 3) erscheinen gegenüber den von mir erzielten Sporenständen sehr fragmentarisch.

Offensichtlich sind Guéguen die meisten Konidienstände bei der Präparation zur mikroskopischen Beobachtung zerbrochen und die Sporen abgefallen. Am vollständigsten und am besten wiedergegeben ist der Konidienstand (Abb. 3, Nr. 36), jedoch zeigt ein Vergleich mit den Mikrophotographien (Abb. 1), daß sie gewöhnlich weit sporenreicher sind, als es in allen Abbildungen von Guéguen gezeigt wird. In die Literatur sind 2 Abbildungen durch R. Meißner übernommen worden („Technische Betriebskontrolle im Weinfach", 1920 und „Mikroskopische Bilder des Mostes und Weines", 1923). Die eine Abbildung stammt von Guéguen und wir erkennen in Meißners Wiedergabe Nr. 38 der Originalabhandlung von Guéguen. Die Wahl dieser Abbildung (Nr. 38) war nicht glücklich, da hier offensichtlich ein vom Deckgläschen gequetschter Konidienstand, d. h. ein einzelner Ast eines Konidienstandes vorlag. Weit besser wäre die Wiedergabe der Nr. 36 von Guéguen gewesen. Die zweite Abbildung, welche Meißner wiedergibt, stammt von Bierberg. Ein Vergleich dieser Abbildung mit den Zeichnungen Guéguens und meinen Mikrophotographien zeigt, daß hier Bierberg bestimmt keinen Konidienstand von Rhacodium cellare vor sich hatte. Ich kann Guéguen völlig beistimmen, wenn er sagt: „la surface couverte de conidiophores rapelle celle d'une culture de Cladosporium herbarum."

Die Konidiosporen von Rhacodium cellare sind schon länger bekannt. Bereits 1883 hat Schroeter sie beschrieben. Guéguen sowohl wie Schroeter weisen auf die Ähnlichkeit mit den Sporen von

[1]) Herr Prof. Dr. Schnegg in Weihenstephan, der in dankenswerter Weise ebenfalls Tröpfchenkulturen mit Rhacodium cellare anlegte, konnte darin auch keine Sporenbildung beobachten.



Abb. 3. Abbildungen der Konidienstände von Guéguen.

Cladosporium herbarum hin. An den Konidienständen erscheinen sie bei schwacher Vergrößerung fast schwarz, bei starker Vergrößerung unter dem Mikroskop dagegen hell-dunkelbraun und hyalin. Die Konidiosporen sind entweder elliptisch oder birnenförmig, meist einzellig, zuweilen auch durch eine Querwand geteilt. Sie sind verhältnismäßig klein, ihre Länge beträgt 5,5—11 μ und ihre Breite nur 2,5—2,7 μ. Die Oberfläche der Konidiosporen ist fast immer eigentümlich rauh gekörnt, wie auch die Oberfläche alter Luftmyzelfäden. Die Keimung der Konidiosporen, die auch bereits Guéguen verfolgt und abgebildet hat, verläuft ganz ähnlich der von Cladosporium- oder Hormodendron-Arten (Abb 4). Die Konidiospore schwillt schwach an, treibt zunächst an einem der Enden, später auch am anderen Ende, selten gleichzeitig an beiden Enden, einen Keimschlauch, der bald Querwände zeigt und zahlreiche Seitenäste bildet, die zur Bildung eines reich verzweigten Myzels führen.

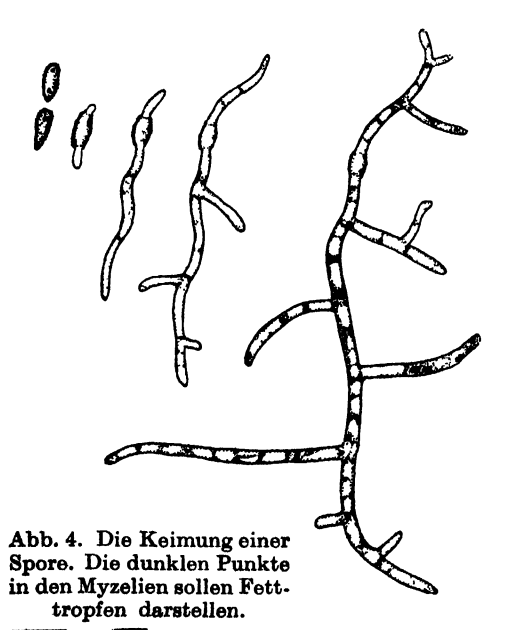


Abb. 4. Die Keimung einer Spore. Die dunklen Punkte in den Myzelien sollen Fetttropfen darstellen.

Das Aussehen des Myzels ist von Guéguen (1906) und Elssmann (1923) eingehend geschildert worden[1]). Unterschiede in den Abbildungen des Myzels von Rhacodium cellare können

[1]) Eine gute Ausbildung des Myzels ist in Kroemer-Krumbholz, „Obst- und Beerenweine", 1932, S. 47 wiedergegeben.

sich leicht ergeben, da das Aussehen des Myzels je nach dem Alter und dem Ernährungssubstrat, wie später bei der Besprechung der Kulturen in flüssigen Nährmedien deutlich gezeigt wird, sehr verschieden sein kann. Die Hyphen sind im Verhältnis zu denen anderer Schimmelpilze sehr fein, sie sind nur 2.2—2,7 μ breit. Alte Myzelfäden aus Weinkellern zeigen immer sehr viel Fetteinschlüsse im Innern und eine körnige Oberfläche. Die körnigen Ausschwitzungen des Myzels scheinen aus einem wachsartigen Stoff zu bestehen, der in Äther und Chloroform löslich ist.

Die systematische Stellung von Rhacodium cellare.

Nachdem erwiesen ist, daß Rhacodium cellare ganz mit Unrecht zu den Pilzen mit sterilen Myzelien gezählt wurde, tritt an uns die Frage heran, wohin er im System der fruktifizierenden Fungi imperfecti zu stellen ist. Guéguen kam auf Grund seiner Untersuchungen zu der Überzeugung, daß Rhacodium cellare in die Familie der Dematiaceae einzureihen ist. Nach unseren Untersuchungen sprechen alle Merkmale dafür, daß Rhacodium cellare in der Familie der Dematiaceae der Abteilung Phaeodidymae, Unterabteilung Cladosporieae und der Gattung Cladosporium zuzuteilen ist. Unser Pilz hat mit der Gattung Cladosporium folgende Merkmale gemeinsam:

1. verhältnismäßig langsames Wachstum,
2. Die Kolonien bilden samtartige Polster, mit weißem glatten Rand,
3. Die Unterseite der Kolonien nimmt von der Mitte beginnend auf Agar oder Gelatine eine tiefschwarze Färbung an, welche bis nahe an den Rand reicht,
4. die Kolonien verflüssigen in ihrer Umgebung Gelatinenährböden,
5. die sich zu Fruchtträgern entwickelnden Hyphen sind von den gewöhnlichen Hyphenzweigen nicht verschieden. Sie sind als Fruchtträgerhyphen erst dann sicher zu erkennen, wenn an ihrem Ende die erste Konidiospore abgeschnürt wird.
6. die Konidienstände stellen ein lockeres, äußerst zerbrechliches Gefüge dar,
7. die Sporen sind länglich, ei- oder birnenförmig, meist einzellig, wenn mehr länglich, dann zweizellig,
8. die Membran der Konidiosporen ist feinkörnig gerauht,
9. die Myzelien enthalten Fett in Form glänzender, stark lichtbrechender Tropfen,
10. in alten Myzelien kommt es zur Bildung dicht verknoteter Hyphenknäuel (Sklerotien).

Aus den geschilderten 10 mit der Gattung Cladosporium gemeinsamen Merkmalen leite ich die Berechtigung ab, Rhacodium cellare Persoon in Cladosporium cellare umzutaufen. Damit kommt sogleich im Namen seine systematische Zugehörigkeit klar zum Ausdruck[1]).

---

[1]) Mit Cladosporium herbarum (Pers.), das auch in Weinkellern vielfach zu finden ist, ist der Kellerschimmel nicht identisch, was mir auch Herr Prof. Dr. H. Schnegg in Weihenstephan, dem ich Kulturen zur Überprüfung übersandte, in dankenswerter Weise bestätigte. Nach einer eingehenden Untersuchung der Kulturen kam er ebenfalls zur Überzeugung, daß der Kellerschimmel eine Cladosporium-Art darstellt und einer Neubenennung in Cladosporium cellare keine Bedenken entgegenstehen. Ich möchte auch an dieser Stelle Herrn Prof. Schnegg für seinen wertvollen Rat und seine freundliche Unterstützung herzlichst danken.

Untersuchungen über die Physiologie des Kellerschimmels.

G. Lüstner (1903) zog den Kellerschimmel mit Erfolg auf Kalkplatten, welche mit Leimwasser durchtränkt waren und Guéguen zog ihn auf Raulinscher Nährlösung mit Glukose, Galaktose, Maltose, Glyzerin oder Inulin, sowie auf Milch, Kartoffelschnitten, mit Milchsäure gesäuerten Kartoffelschnitten, Karotten, Topinambur, Reisstärke, Eiweiß, Eichen- und Tannenholz mit Erfolg. Peglion züchtete Cladosporium (Rhacodium) cellare auf Edelkastanien und gibt an, daß der Pilz in Aufbewahrungsräumen von Edelkastanien in Italien diese überzieht und vollständig schwarz färbt. Im Gegensatz zu Bierberg kann ich diese Angaben von Peglion insofern bestätigen, als ich fand, daß der Kellerschimmel auf rohen oder gekochten Edelkastanien sehr gut wächst.

Nachstehende Aufstellung gibt eine Übersicht der festen Nährmedien, welche ich dem Kellerschimmel geboten habe.

So interessant all diese Versuche an sich sind, da sie einen ungewöhnlich großen Enzymreichtum des Kellerschimmels andeuten, so sagen sie doch nichts darüber aus, von welchen Substanzen die riesigen Myzelvegetationen an den Gewölben von Wein- und Essigkellern ernährt werden. Nicht nur, daß der Pilz die Keller- und Faßwände besiedelt, erstaunlicher ist noch, daß er Eisengestelle, Glasflaschen, Porzellanschirme von elektrischen Lampen, eiserne Lüster wie im Weinkeller des berühmten Schlosses Johannisberg im Rheingau, Wachs- oder Stearinkerzen überzieht und sogar von blanken Eisendrähten in langen Strähnen herunterhängt. Das Studium seines natürlichen Vorkommens führte zu der Vermutung, daß es nicht anders sein könnte, als daß der Pilz von flüchtigen, in der Luft der Wein- und Essigkeller vorkommenden chemischen Verbindungen leben müsse.

Nährböden	Wachstum
Würzeagar	sehr gut und relativ schnell (Sporen)
Mostgelatine	gut, Stillstand durch Verflüssigung
Traubenmost von 1—10% Zuckergehalt	sehr gut
Apfelfleisch	sehr gut, starke Bräunung der Umgebung
Birnenfleisch	sehr gut, schwache Bräunung der Umgebung
Orangenfleisch	sehr gut
Orangenschale	gut, langsamer
Zitronenfleisch	langsam, tiefgrüne Polster
Käferpanzerdekokt	sehr gut, braunes Myzel
Buchenlaub	langsam
Torfmull	langsam
Käferelytren in aqua dest.	üppiges Wachstum, graues Myzel
Fliegen-, Käfer-, Spinnen- und Wespenleichen auf Nadeln gespießt, in feuchter Atmosphäre	auffallend gut (siehe Abb. 8)
Edelkastanien roh, abgeflammt	gut
Edelkastanien, gekocht	sehr gut, tiefgrünes, später schwarzes Myzel
Bananenfleisch	sehr gut
Bananenschalen	gut
Kürbisschnitten	sehr gut, in 6 Wochen aufgezehrt

Zur experimentellen Erhärtung dieser Vermutung wurde eine Versuchsanordnung von Lindner[1]) gewählt, sie wurde jedoch dahingehend vereinfacht, daß nur eine Flasche nötig war. Der Flasche mit der C-freien Nährlösung wurde nämlich ein Kroemerscher Gärspund aufgesetzt, der als Sperrflüssigkeit Alkohol oder andere flüchtige Kohlenstoffquellen enthielt und oben verschlossen war. Diese Versuchsanordnung bot den großen Vorteil, daß die Kulturen weniger Platz beanspruchten und sie leichter zu handhaben waren. Die C-freie Nährlösung enthielt nach der Vorschrift von Lindner: 0,025% $MgSO_4$; 0,5% KH_2PO_4; 0,5% $(NH_4)_2SO_4$ in Leitungswasser.



Abb. 5. Cladosporium cellare, gezogen mit Dämpfen von: 1. Äthylalkohol (2 Monate alt). 2. Essigsäureamylester (6 Wochen alt). 3. Amylalkohol (2 Monate alt). 4. Acetaldehyd (6 Wochen alt). 5. Aqua destillata. 6. Thermostatenluft.

Wie die Abbildungen 5 und 6 zeigen, vermag Cladosporium cellare eine ganze Reihe flüchtiger organischer Verbindungen als C-Quelle auszunutzen. Mit Äthylalkohol- oder Acetaldehyddämpfen wachsen Vegetationen, die sich in nichts von natürlichen Vegetationen aus Weinkellern unterscheiden. Wie aus nachfolgender Zusammenstellung zu ersehen ist, kann Cladosporium cellare nicht nur von Alkoholdämpfen sich völlig ausreichend ernähren, sondern auch die verschiedensten Ester auswerten.

Diese Versuchsergebnisse bestätigen eine weitverbreitete, alte Ansicht der Weinküfer und Kellermeister, „daß der Kellerschimmel die Kellerluft reinigt". Wie die Versuche beweisen, entzieht er der Kellerluft die bei der Weingärung durch die Kohlensäure sozusagen „mitfortgerissenen" und die bei der Lagerung durch Verdunstung aus den Faß-

[1]) P. Lindner, „Mikroskopische und biologische Betriebskontrolle in den Gärungsgewerben", S. 272—275.

poren austretenden Alkohol- und Esterdämpfe. Diese interessanten physiologischen Eigenschaften des Kellerschimmels machen es vollauf verständlich, daß er ausschließlich in Wein- und Essigkellern so üppige Vegetationen bildet. Mit Essigsäure gedeiht er auch, wenn auch lange nicht so gut wie mit Alkoholdämpfen. Weit besser gedeiht er mit den verschiedensten Essigsäureestern. In Essigkellern stehen ihm in geringem Maße sicher auch Alkoholdämpfe, neben Essigsäure- und Esterdämpfen zur Verfügung.

Den Weg zur Entdeckung der Fähigkeit zur Ausnützung dampfförmiger Kohlenstoffverbindungen hat mir der Pilz in bemerkenswerter Weise selbst



Abb. 6. Cladosporium cellare, kultiviert mit Dämpfen von: a) obere Reihe: Gefäße mit Gärspunden, von links nach rechts, geimpft 17. IV., photographiert 5. VI. 1. Propylalkohol. 2. Essigsäureaethylester. 3. Normalbutylalkohol. 4. Essigsäuremethylester. 5. Propionsäure. 6. Isobutylalkohol. b) Untere Reihe: Gefäße ohne Gärspunde. 7. Zusatz von 1,9% Aethylalkohol. 8. Zusatz von 5,0‰ Zitronensäure. 9. Zusatz von Stearinsäure. 10. Zusatz von 5,0‰ Mannit. 11. Zusatz von 3,0‰ Bernsteinsäure. (Diese Reihe geimpft am 5. V. 1935.)

gewiesen. Zeitlich einige Monate bevor ich die erwähnten Dampfernährungsversuche ansetzte, hatte ich eine Reihe von Versuchen angestellt, in denen einer kohlenstofffreien Nährlösung die verschiedensten Fruchtsäuren, Stärke, Gerbstoff usw. zugesetzt worden war. Als Testversuch impfte ich 2 Flaschen mit dem Pilz, die lediglich die C-freie Nährlösung enthielten. Alle diese Einzelgefäße waren mit Wattestopfen verschlossen und standen in einem Thermostaten bei 25° C, in dem sich auch einige Gärversuche und Hefekulturen befanden.

Zu meinem Erstaunen stellten sich in kurzer Zeit auch in den C-freien Nährlösungen für Cladosporium cellare typische Vegetationen ein. Dieses unerwartete Verhalten fand durch die Dampfernährungsversuche

seine Erklärung. Der Pilz vermag von den Alkohol- und Esterdämpfen, die in der Luft von Thermostaten, in denen Hefen kultiviert werden, vorhanden sind, hinreichend zu leben. In weiteren Versuchen, die mit einem wassergefüllten Gäraufsatz oder mit einem Gummistopfen verschlossen worden waren, kam der Pilz über die Keimung der Konidiosporen nie hinaus. Mit dem Nachweis der Fähigkeit, allein mit der Hefe-Thermostatenluft als Kohlenstoffquelle leben zu können, ist in einfacher Weise bewiesen, daß unser Pilz in Weinkellern nur von „der Luft" lebt; denn im Prinzip sind die Verhältnisse in einem Thermostaten mit Hefekulturen und in einem Weinkeller nach diesen Gesichtspunkten die gleichen.

Diese Befunde zwangen mich, eine ganze Reihe von Versuchsgefäßen, die mit Watteverschluß versehen waren und in einem Thermostaten mit Hefekulturen gestanden hatten, mit Gummistopfen- oder paraffiniertem Korkstopfenverschluß zu wiederholen. Denn wenn z. B. der Pilz in Milchsäure, Weinsäure oder auf Stearinsäure gedieh, so war ja keine Garantie mehr vorhanden, daß er ausschließlich von diesen Kohlenstoffverbindungen sich ernährt hatte. So hatten sich die schönen, wenn auch nicht großen Pilzpolster auf feuchtem Filtrierpapier in Wirklichkeit aus den durch den Watteverschluß hindurchdiffundierenden flüchtigen organischen Stoffen der Thermostatenluft aufgebaut und nicht aus Zellulose; denn nach Wiederholung des gleichen Versuches mit undurchlässigen Verschlüssen traten auf dem Filtrierpapier nur ganz unscheinbare Vegetationen, bestehend aus Hungermyzel, auf.

Die Ernährungsversuche von Cladosporium cellare mit Dämpfen verschiedener flüchtiger, organischer Stoffe sind nach verschiedener Richtung interessant.

1. Sie beweisen, daß Lindner und andere vollauf recht haben mit ihrer Meinung, Alkohol sei kein so starkes Organismengift, wie man früher annahm, es könne vielmehr in niedrigen Konzentrationen sehr leicht assimiliert werden.

Übersicht über die Dampfernährungsversuche.

0 = kein Wachstum; + = Wachstum; ++ = sehr gutes Wachstum.

Kohlenstoffverbindung	Allgemeines Wachstum	Luftmyzel	Untergetauchtes Myzel
Valeriansäure	0	0	0
Propionsäure-Äthylester	0	0	0
Methylalkohol	schwach	schwach	0
Essigsäure	schwach	schwach	schwach
Formalin 19 Vol.-%	+	+	+
Essigsäuremethylester	+	+	+
N-freie Nährlösung + Äthylalkohol	+	+	+
N-freie Nährlösung + Äthylalkohol und Ammoniak	++	++	++
Amylalkohol	+	+	+
Propylalkohol	+	+	+
Essigsäureamylester	+	+	+
Isobutylalkohol	+	+	+
Normalbutylalkohol	+	+	+
Azetaldehyd	++	++	++

2. Bemerkenswert ist ferner, daß es gelingt, den Pilz mit Formaldehyddämpfen zu ernähren. Wenn auch der Pilz dabei keine üppigen Vegetationen bildet und sehr langsam bei Formalinernährung wächst, so deutet diese Tatsache doch darauf hin, daß auch Formaldehyd kein allgemeines Organismengift ist und glatt assimiliert werden kann. Das Myzel bei Formalinernährung färbt sich mit Jodjodkalium tiefbraun. Während die Membranen ganz normal erscheinen, sind die Zellinhalte auffallend arm an Plasma und Inhaltsstoffen.

3. Der Versuch mit Azetaldehyd und der Fettreichtum der Myzelien bei Azetaldehyd- und Alkoholernährung bestätigen die Anschauung von Haehn und Kintoff, daß „Azetaldehyd die Brücke zwischen Kohlenhydraten und Fetten" sei (Abb. 7).

Übersicht über die Versuche mit Zusatz von Fettsäuren usw. zu C-freien Nährlösungen.
0 = kein Wachstum; + = Wachstum; ++ = sehr gutes Wachstum.

Kohlenstoffverbindungen	Allgemeines Wachstum	Luftmyzel	Untergetauchtes Myzel	Sporenbildung
Ameisensäure (5%)	0	0	0	0
Oxalsäure (1%).	schwach	schwach	schwach	0
Racem-Apfelsäure (2%)	0	0	0	0
Stearinsäure	+	+	+	0
Bernsteinsäure (5%)	+	+	++	+
Zitronensäure (5%)	+	+	++	+
Weinsäure (5%)	+	+	+	+
Milchsäure (10%)	+	+	++	+
Gerbsäure (10%)	+	+	++	+
Amylum solubile (1%)	+	+	++	0
Glyzerin (1%)	+	+	++	0
Glyzerin (6,3%)	+	+	++	0
Mannit (5%)	++	++	++	+
Glykokoll (1%)	+	+	++	0
Dextrin (2%)	++	++	++	+
Citrus-Pektin (2%)	++	++	++	0
Asparaginsäure (1%)	++	++	++	0

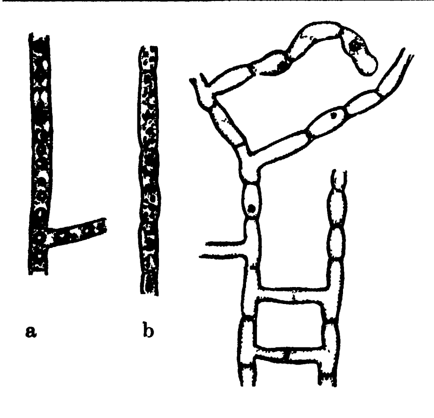


Abb. 7. a) Untergetauchtes Myzel bei Azetaldehydernährung; b) untergetauchtes Myzel bei Manniternährung; c) untergetauchtes Myzel bei Formaldehydernährung. (Fetteinschlüsse schwarz gezeichnet.)

Cladosporium cellare wäre ein dankbares Versuchsobjekt für Biochemiker. Der Chemismus dieses Pilzes ist so interessant, daß er eingehender Untersuchungen wert wäre, zumal er sich in der von mir angegebenen Weise leicht kultivieren läßt. Vor allem wäre es notwendig, die verschiedenen, vom Pilz erzeugten Enzyme genauer zu studieren.

Mit Mannit oder Glyzerin ernährt, strotzt das Myzel des Pilzes von Fetteinschlüssen (Abb. 7 a). Besonders gut sagen ihm unter den Fettsäuren Bernstein-, Zitronen- und Milchsäure zu. Die dunkelgrüne Färbung des Luft- und untergetauchten Myzels rührt hierbei von den Fetteinschlüssen her.

Kann der Kellerschimmel dem Wein schaden?

Von den Weinfachleuten wird diese für die Kellerwirtschaft wesentliche Frage in verschiedener Weise beantwortet. Weit verbreitet ist die Anschauung, daß der Kellerschimmel dem Wein im Keller nichts schade, sondern daß er dort sehr nützlich sei, indem er die Kellerluft reinige und den Feuchtigkeitsgehalt der Kellerluft günstig reguliere. Von den Vertretern dieser Auffassung werden mit dem Kellerschimmel überwucherte Kellerräume als ideale Weinlagerkeller bezeichnet. Die Anwesenheit des Kellerschimmels wird als sichtbares Zeichen des „richtigen Kellerklimas" angesehen.

Andere Weinfachleute bestreiten die Harmlosigkeit dieses Pilzes und behaupten sogar, daß der Pilz dem Wein z. B. auf den Flaschenlagern durch Überwucherung und Eindringen in die Korkstopfen schaden und den sog. „Stopfengeschmack" erzeugen könne. Aus dieser Anschauung heraus bemühen sich diese Weinfachleute, den Schimmel durch Abreißen, ständiges Kalken der Kellerwände oder durch häufiges, scharfes Schwefeln der Kellerräume zu vernichten oder fernzuhalten.

Um über die Berechtigung der in der Praxis der Kellerwirtschaft herrschenden Ansichten entscheiden zu können, wurden folgende Versuche angesetzt:

1. Kulturversuche auf Flaschenkork.
2. Kulturversuche auf Wein, Traubenmost oder letzterem mit verschiedenem Alkoholgehalt.

Die Kulturversuche auf Flaschenkork ergaben, daß er auf diesem als alleiniger Kohlenstoffquelle ganz gut leben kann. Er wächst mit Vorliebe alten Lentizellengängen entlang und durchsetzt nur auf diesem Wege den Kork. Kocht man die Korkstücke mehrmals aus, so wächst er auf diesen Stücken kaum merklich, dagegen in dem Flaschenkorkdekokt weitaus besser, ein Zeichen also, daß er im Kork nur die löslichen Bestandteile, hauptsächlich Gerbsäure, verzehrt. Er ließ sich ja, wie bereits erwähnt, mit Gerbstoffzusatz in sehr geringen Mengen zu C-freien Mineralsalzlösungen (nach Lindner) ebenfalls gut kultivieren.

Sodann wurde der Pilz auf Traubenmost von 47,5° Öchsle und gesteigertem Alkoholgehalt von 0,5, 1, 1,5, 2, 2,4, 2,9, 3,8, 4,8, 5,7, 6,7, 7,7, 8,6 und 9,6 Vol.-%, außerdem auf C-freier Mineralsalzlösung unter Zusatz von Aethylalkohol in Konzentrationen von 2, 5, 7, 10 und 12 Vol.-% geimpft. In der Versuchsreihe von Traubenmost war Cladosporium cellare bis zu Alkoholkonzentrationen von 2,9 und in der C-freien Mineralsalzlösung nur bis 2% Alkohol gewachsen. Von diesen Konzentrationen aufwärts war keine Keimung, trotz zweimal wiederholter Impfung der übertragenen Sporen und Myzelien, eingetreten. Ab 1,5% Alkoholgehalt war beim Versuch mit Traubenmost schon stark gehemmtes Wachstum zu beobachten. Da selbst unsere naturreinen Apfelweine höhere Alkoholgehalte als 2,9 Vol.-% aufweisen, kann Cladosporium cellare in keinem unserer Weine wachsen. Es steht hiermit außer Zweifel, daß er keinen Wein anzugreifen vermag.

So bleibt schließlich von den Einwänden gegen den Kellerschimmel nur noch einer übrig: Übertragung eines Pilzgeruches oder Pilzgeschmackes auf den Wein bei gelungener Durchwucherung des Korkstopfens auf Flaschen. Wie die Kulturversuche von Cladosporium cellare auf Most mit verschiedenem Alkoholgehalt einwandfrei ergaben, stellt er bei Konzentrationen von 3,9 Vol.-% sein Wachstum vollständig ein. Aber

man könnte daran denken, daß sein Myzel beim Auftreffen auf Wein im Flaschenkorken abgetötet wird und „muffige“ Stoffe ausgelaugt werden, die sich dem Inhalt der Flasche mitteilen.

Daher impfte ich den Pilz auf Traubenmost von 30 und 40° Öchsle in 6 Flaschen und ließ ihn 4 Monate bei 25° in einem Thermostaten wachsen, bis er auf dem Most eine dichte, zusammenhängende Decke gebildet hatte. Nach dieser Zeit wurde der Most von dem Myzel abgegossen und eine Geschmacksprobe vorgenommen. Zirka 8 Tage vor der Geschmacksprobe war ein bis dahin nichtbeimpfter Teil des verwendeten Traubenmostes mit Penicillium glaucum geimpft worden, um einen Vergleich zu haben. Zwei Weinkenner konnten ebensowenig wie ich einen Pilzgeschmack oder Pilzgeruch an den mit Cladosporium cellare behandelten Proben feststellen. Dagegen war allein schon durch die Geruchsprobe der mit Penicillium glaucum behandelte Most aus den Proben herauszukennen.

Nach 10 Monaten wurde nochmals eine Geschmacks- und Geruchsprobe vorgenommen. Unterdessen hatte der Pilz auf der Oberfläche des Mostes eine derart dichte Decke gebildet, daß man das Gefäß ohne Gefahr auf den Kopf stellen konnte und den Rasen durchstechen mußte, um eine Probe Most zu entnehmen. Der Most hatte in 10 Monaten eine grünliche Farbe angenommen und trotzdem war weder ein Schimmelpilz-Geschmack noch -Geruch festzustellen. Günstiger als in diesen Versuchen kann man die Wachstumsbedingungen des Kellerschimmels überhaupt nicht mehr gestalten. Er kann also unmöglich, wie heute noch viele Praktiker annehmen und J. Wortmann in seinen „Wissenschaftlichen Grundlagen der Weinbereitung und Kellerwirtschaft“ 1905 behauptet, dem Wein einen schlechten, typischen Schimmelpilzgeschmack verleihen. J. Wortmann sagt wörtlich (S. 72): „Gar mancher alte gute Wein ist durch diese Wirkung des Rhacodium cellare leer und matt gemacht oder geschmacklich herabgesetzt worden“. J. Wortmann betonte ferner, daß der Kellerschimmel nicht nur auf den Flaschenkorken, sondern auch auf den Weinfässern schädlich wäre, und riet, mit dem Pilz befallene Fässer und Holzgeräte mit verdünntem, reinem Alkohol von Zeit zu Zeit abzureiben. Mit Alkoholabreibung können wir aber den Kellerschimmel nicht nur nicht vertreiben, sondern sogar ernähren und fördern. Daher ist dieser Vorschlag von J. Wortmann grundverkehrt. Wenn man den Pilzanflug auf Weinfässern verhindern will, so verwende man lieber reines Wasser oder eine verdünnte wässerige SO_2-Lösung. Von praktischer Seite wird auch vielfach darauf hingewiesen, daß die Rasen des Kellerschimmels allerlei schädlichen Tieren, besonders Insekten, Unterschlupf bieten. F. Stellwaag, der die in Weinkellern vorkommende Fauna systematisch studierte und 28 Arten darin feststellte, kam zu folgendem Schluß: „In den von mir untersuchten Lagerkellern spielen die aufgeführten Arten keine wirtschaftliche Rolle. Anders jedoch, sobald es sich um Flaschenkeller handelt“. Demnach können die Bedenken gegen den Kellerschimmel als Beherberger einer schädlichen Tierwelt nur für Flaschenkeller gelten. Der größte Schädling der Flaschenkeller ist bekanntlich die Korkmotte Tinea cloacella Hb. Ihr Vorkommen ist aber nicht an die Anwesenheit des Kellerschimmels gebunden. Die Korkmotte kommt in Flaschenkellern vor, ob Cladosporium cellare vorhanden ist oder nicht. Das jährliche Tünchen der Keller als Vorbeugungsmittel und zur Bekämpfung gegen tierische Schädlinge be-

zeichnet Stellwaag als unwirksam. Wenn also das jährliche Tünchen, welches das wirksamste Mittel gegen den Kellerschimmel ist, gegen die tierischen Schädlinge unwirksam ist, so kann daraus keine indirekte Schädlichkeit des Kellerschimmels als Beherberger zahlreicher Kellertiere abgeleitet werden.

Daß die Myzelpolster, vor allem alte Polster des Kellerschimmels, allerlei Tiere beherbergen, ist richtig. So konnte ich bei der mikroskopischen Untersuchung von Myzelien aus Kellern wiederholt darin Milben beobachten, welche junges Myzel fraßen. Andererseits konnte ich auch beobachten, daß Insektenleichen oder Larvenhäute von Myzelien des Kellerschimmels ganz dicht umsponnen waren. Wie Kulturversuche auf Käferpanzern und Insektenflügeln zeigen (Abb. 8), muß der Pilz ein chitinlösendes Enzym (Chitinase) haben[1]). Da ich die von älteren Forschern als Pykniden angesprochenen Gebilde in künstlichen Kulturen des Pilzes nie bekam, bin ich geneigt anzunehmen, daß diese Sklerotien (es sind keine Pykniden, denn es fehlen Sporen darin) in den Kellern durch dichtes Umspinnen und allmähliches Auflösen von Chitinresten, Larvenhäuten, Insektenkot usw. entstehen. Chitin stellt nämlich für den Pilz im Keller an vielen Stellen wahrscheinlich die einzige Stickstoffquelle dar; denn Ammoniak- oder sonstige stickstoffhaltige Dämpfe entstehen weder bei der Weingärung noch bei der Weinlagerung. Wenn auch der Pilz auf N-armen Substraten verhältnismäßig gut gedeiht, so reagiert er doch mit dem doppelten Wachstum bei Stickstoffzugabe.

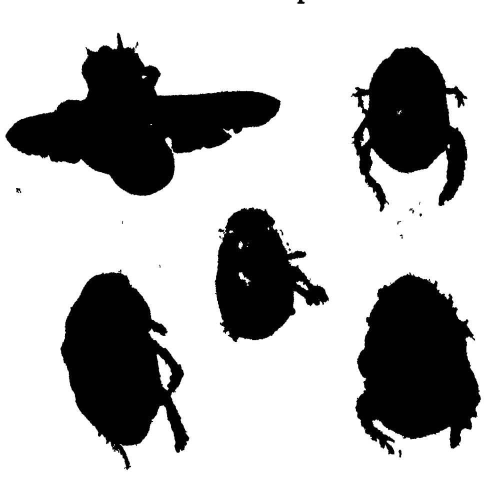


Abb. 8. Cladosporium cellare auf alte Insektenkörper aus einer Sammlung geimpft.

Zuletzt wäre noch die Behauptung zu streifen, daß der Kellerschimmel den Feuchtigkeitsgehalt der Kellerluft reguliere. Es wird vom Praktiker behauptet, daß er bei hohem Feuchtigkeitsgehalt aus der Luft Wasser aufnähme und bei niedrigem abgäbe. Diese Ansicht der Praktiker ist sehr wahrscheinlich richtig. Man kann an den künstlichen Kulturen auf flüssigen Nährböden sehr schön beobachten, wie sich in einer Unzahl feinster Tropfen Kondenswasser an dem reichverzweigten Luftmyzel niederschlägt. Ebenso kann man Kulturen auf feuchtem Filtrierpapier austrocknen lassen, in eine Atmosphäre mit Alkohol- und Wasserdampf gebracht, wachsen die Kolonien unter Neubildung von Luftmyzel wieder weiter.

In Süßmostkellern darf der Pilz nicht geduldet werden. Sporen sowohl wie Myzelstücke vermögen in Trauben- und

[1]) Nach Petri (siehe Literaturnachweis) befällt Cladosporium aphidis Thüm ursprünglich die Außenseite, nach dem Absterben auch das Innere von Rebläusen. Auf Reblaus-Leichen kommt ferner Hormodendron cladosporioides Sacc. vor. Cladosporium herbarum Lk. befällt Beine, Fühler, sowie die Eier von Rebläusen. Alle diese Pilze können sich allein auf Kosten der Häute der Rebläuse ausreichend ernähren. Petri nimmt an, daß diese Pilze aus Chitin Glukosamin abspalten können.

Apfelmost bis zu 70—80° Öchsle selbst bei vollständigem Luftabschluß in der Flasche zu flockenartigen Kolonien auszuwachsen. Wenn er im Süßmost direkte Umsetzungen so schnell nicht hervorruft, so sind doch Süßmoste mit Trübungen dieser Art unverkäuflich.

Zusammenfassung der Ergebnisse.

1. Alle äußeren Merkmale weisen darauf hin, daß Rhacodium cellare Persoon in die Gattung Cladosporium einzureihen ist. Es wird daher eine Umbenennung in Cladosporium cellare vorgeschlagen.

2. Die interessanteste physiologische Eigenart von Cladosporium cellare ist sein Vermögen, Alkohol-, Ester- und flüchtige Säuredämpfe zu assimilieren. Daraus erklärt sich sein ausschließliches Vorkommen in Wein- und Essigkellern.

3. Der Pilz vermag eine erstaunlich große Zahl organischer Verbindungen als Kohlenstoffquellen auszubeuten. Er muß also über einen großen Enzymreichtum verfügen. Der Nachweis der einzelnen Enzyme steht noch aus. Bemerkenswert ist ferner, daß der Pilz Insektenchitin anzugreifen vermag, was auf ein chitinspaltendes Enzym hindeutet.

4. Trotzdem Cladosporium cellare von Alkoholdämpfen zu leben vermag, gedeiht er auf Nährböden mit mehr als 3 Vol.-% Alkohol nicht mehr, ab 1,5 Vol.-% wird er bereits deutlich im Wachstum gehemmt. Daraus ergibt sich, daß er Obst- und Traubenweine, die normalerweise stets mehr als 3 Vol.-% Alkohol haben, nicht angreifen kann. Typisch für den Pilz ist ferner, daß er keinen „Schimmelpilzgeruch" entwickelt. Er kann also auch geruchlich den Wein nicht schädigen. Während Vegetationen von Cladosporium cellare in Weinkellern unbedenklich geduldet werden können, können solche in Süßmostereien leicht unangenehme Infektionen hervorrufen. Dort ist also zu empfehlen, den Kellerschimmel nicht zu dulden.

Literaturnachweis.

Bierberg, W., Rhacodium cellare Pers. Bericht der Königl. Lehranstalt für Wein-, Obst- u. Gartenbau in Geisenheim a. Rh. 1909. S. 178. Berlin (Parey) 1910. — Elssmann, E., Der Kellerschimmel (Rhacodium cellare Pers.). (Wein u. Rebe. Jahrg. 1925. S. 20—25.) — Guéguen, M. F., La moissisure des caves et des celliers; étude critique, morphologique et biologique sur le Rhacodium cellare Pers. (Bull. Soc. Myc. de France. 22. 1906. p. 77—78 u. 146—163.) — Haehn, H. und Kintoff, W., Über den Mechanismus bei der Fettbildung in der lebenden Zelle. (Ber. d. dtsch. chem. Ges. 56. 1923. S. 439—445.) — Janke, A., Allgemeine technische Mikrobiologie. I. Teil der Mikroorganismen. Dresden-Leipzig (Verl. Steinkopf) 1924. — Kloecker, A., Die Gärungsorganismen in der Theorie und Praxis der Alkoholgärungsgewerbe. Berlin-Wien (Verl. Urban & Schwarzenberg) 1924. — Kroemer, K. und Krumbholz, G., Obst- und Beerenweine. Braunschweig (Verl. Dr. Serger & Hempel) 1932. — Lindau, G., Fungi imperfecti in Rabenhorsts Kryptogamenflora von Deutschland, Österreich und der Schweiz. VIII. Abt. Leipzig 1907. — Lindner, P., Mikroskopische Betriebskontrolle in den Gärungsgewerben. VI. Aufl. Berlin 1930. — Lüstner, G., Untersuchungen über Rhacodium cellare. (Ber. d. Lehr- u. Forschungsanstalt Geisenheim, Berichtsjahr 1903. S. 191. Parey-Berlin.) — Meißner, R., Technische Betriebskontrolle im Weinfach. Stuttgart 1920. — Ders., Mikroskopische Bilder des Mostes und Weines. Stuttgart 1923. — Peglion, V., Intorno ad un caso di emiparasitismo del Rhacodium cellare Pers. (R. Acad. Lincei Roma 14. Vol. Ser. 2. Nr. 12. 1905.) — Petri, L., Contributo alla conoscenza dei microorganismi viventi nelle galle filloseriche della vite. (Ann. myc. 7. Bd. Berlin 1909.) — Schnegg, H., Das mikroskopische Praktikum des Brauers. II. Teil: Gärungs-

organismen. Stuttgart 1922. — Schroeter, Bemerkungen über Keller- und Grubenpilze. (Jahresber. d. Schles. Ges. f. Pilzkunde. Bd. 61. 1883.) — Stellwaag, F., Die Tierwelt tiefer Weinkeller. Wein u. Rebe. Jahrg. 5. 1924. S. 277—297.) — Wortmann, J., Die wissenschaftlichen Grundlagen der Weinbereitung und Kellerwirtschaft. Berlin (Parey) 1905.

Fußkrankheit und Wurzelfäule der Lupine.

(Erreger: Rhizoctonia solani K.)

[Aus der mikrobiologisch-chemischen Abteilung der Biologischen Reichsanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem.]

Von **H. Richter.**

Mit 8 Abbildungen im Text.

Die Fußkrankheit der Lupinen, die in den verschiedensten Entwicklungsstufen der Pflanzen auftreten kann und durch eine Schädigung des Wurzelhalses und der Wurzeln charakterisiert ist, hat bisher keine eingehende Bearbeitung erfahren. Da in einem gewissen Stadium der Krankheit die Pflanzen welken und vertrocknen, wird sie häufig als Lupinenwelke bezeichnet, und auf Fusariumbefall zurückgeführt. Es hat sich aber gezeigt, daß die Bezeichnung Lupinenwelke allmählich zu einem Sammelbegriff geworden ist, der Krankheitserscheinungen mit verschiedenen Ursachen umfaßt. Man hat dabei vor allem drei Krankheiten, die das Auftreten von Welkesymptomen gemeinsam haben, streng auseinander zu halten: 1. Die echte Welkekrankheit der Lupinen, bei der zunächst lediglich die Gefäße (Xylem) verpilzt und gebräunt sind und über die später berichtet werden soll, 2. die Virusbräune[1]), bei der anfangs unregelmäßige, braunstreifige Stengelverfärbungen und Sproßverkrümmungen auftreten und 3. die in Rede stehende Fußkrankheit, bei der die Angriffe des Erregers auf Wurzelhals und Wurzel beschränkt sind. Schikorra[2]), der bei seinen Untersuchungen über Fusariumkrankheiten der Leguminosen auch die Lupinenwelke erwähnt, glaubt, daß sie durch Fusariumarten verursacht wird. Seine Beschreibung läßt aber weder erkennen, ob er die echte Welkekrankheit oder eine Fußkrankheit, noch welche Fusariumart er vor sich gehabt hat.

Krankheitsbild.

Das Krankheitsbild (Abb. 1), das an Lupinus angustifolius, L. luteus und L. albus beobachtet wurde, ist je nach dem Alter der Pflanzen und der herrschenden Witterung unterschiedlich. Oft kümmern die Pflanzen eine Zeitlang, bleiben im Wachstum zurück, die grüne Farbe

[1]) Richter, H., Eine noch nicht aufgeklärte Lupinenkrankheit. (Nachrichtenblatt f. d. Dtsch. Pflanzenschutzdienst. Bd. 14. 1934. Nr. 9, S. 81—82.) — Köhler, E., Untersuchungen über die Lupinenbräune (Viruskrankheit). (Ebenda. Bd. 15. 1935. Nr. 10, S. 90—91.) — Neill, J. C., Brien, R. M., and Chamberlain, E. E., "Sore-shin": A virus disease of Blue Lupins. (Sonderdruck New Zealand Journ. Agric. Vol. 49. 1934.) — Chamberlain, E. E., Sore-shin of Blue Lupins. Its identity with pea mosaic. (Ebenda. Vol. 51. 1935. p. 86—92.)

[2]) Schikorra, G., Fusariumkrankheiten der Leguminosen. (Arb. K. Biol. Anst. f. Land- u. Forstw., Bd. 5. 1907. S. 173—178, 180—183.)

wird blasser, leicht gelblich, und endlich beginnen die Blätter zu welken und zu vertrocknen. Die jüngeren Blätter werden schlaff und trocknen in herabhängendem Zustand ein. Bei älteren Blättern beschränkt sich das Eintrocknen zunächst nur auf die Fiederblättchen, die bald abgeworfen werden, während die Blattstiele anfangs aufrecht stehen bleiben und erst später abfallen. Der geschilderte Krankheitsverlauf kann sich über längere Zeit hinziehen, oder auch schlagartig, gewissermaßen von einem Tage zum anderen erfolgen. Bei jungen Pflänzchen, bei denen der Stengel noch nicht verholzt ist, tritt häufig plötzliches Umfallen ein. Ältere Pflanzen, die schon gut ausgebildete Hülsen angesetzt haben, werfen plötzlich die Blätter ab und es tritt eine Art Notreife ein, die Früchte vertrocknen völlig oder ergeben nur Kümmerkörner.

Zieht man kranke Pflanzen aus dem Boden, so reißen sie häufig dicht

Abb. 1. Fußkrankheit an Lupinus angustifolius, einem Feldbestand entnommen, links gesunde Pflanze.



Abb. 2. Typische Rhizoctonia-Schäden an Wurzeln von Lupinus angustifolius, im Gewächshaus aufgetreten.

unter der Erdoberfläche ab und die Wurzeln sind abgestorben, dunkelbraun in mehr oder weniger starke, trockene Fäulnis übergegangen. Oft finden sich auch nur örtlich begrenzte, rötlich braune, leicht eingesunkene Faulstellen an der Hauptwurzel oder am Wurzelhals. Wenn die Schädigung an der Hauptwurzel von unten nach oben fortschreitet, werden nicht selten über der Befallszone immer wieder neue Sekundärwurzeln gebildet, die aber in der Regel nach und nach auch erkranken (Abb. 2). In Ausnahmefällen tritt ein Stillstand der Wurzelfäule ein, die Sekundärwurzeln übernehmen die alleinige Ernährung der Pflanze, die zwar gegenüber den gesunden im Wachstum zurückbleibt, aber bis zur normalen Fruchtreife gelangt.

Erreger.

Am Fuße älterer, völlig abgestorbener Pflanzen finden sich fast immer die Sporenlager von Fusariumarten. Auch in dem kranken Gewebe jüngerer Stadien ist fast stets Fusariummyzel festzustellen. Bei systematischen Iso-

lierungsversuchen wurden im Laufe der Zeit von fußkranken Lupinenpflanzen 12 Fusariumarten und Varietäten mit unterschiedlicher Häufigkeit isoliert, die verschiedentlich mit Rhizoctonia vergesellschaftet waren. Diese Uneinheitlichkeit der Fusariumflora legte die Vermutung nahe, daß es sich dabei um Saprophyten oder Schwächeparasiten handelt, die sich auf den durch Rhizoctonia geschädigten Pflanzen ansiedeln. Ob allerdings alle an fußkranken Lupinen auftretenden Fusarien sekundär sind oder ob sich darunter auch echte Parasiten befinden, muß späteren Untersuchungen vorbehalten bleiben. Zunächst soll nur der Frage des Rhizoctoniabefalles nachgegangen werden.

Bei weiteren Isolierungsversuchen ließ sich denn auch Rhizoctoniamyzel viel häufiger nachweisen als es anfangs den Anschein hatte, und in einigen



Abb. 3. H y p o c h n u s s o l a n i an L u p i n u s a n g u s t i f o l i u s, aus einem erkrankten Feldbestand.

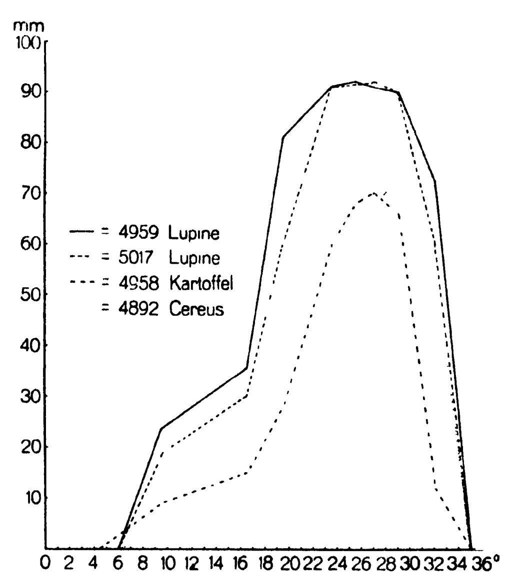


Abb. 4. Temperatureinfluß auf Wachstumsgeschwindigkeit des Myzels.

Fällen wurde an fußkranken Pflanzen von L u p i n u s a n g u s t i f o l i u s, die kurz vor der Samenreife standen, sogar die höhere Fruchtform, H y p o c h n u s s o l a n i Prill. et Del., gefunden (Abb. 3). Der Pilz (Basidiosporengröße: 7,5—10,5 × 4—6; Durchschnitt 9,07 × 4,99 μ) war von dem Erreger der „Weißhosigkeit" der Kartoffel nicht zu unterscheiden. Ebenso waren Unterschiede zwischen den von dem Hypochnusstadium isolierten Myzelien und den aus krankem Wurzelgewebe erhaltenen nicht feststellbar. Es handelt sich also um R h i z o c t o n i a s o l a n i K.

Für die Untersuchungen wurden außer den von Lupinen isolierten Pilzstämmen noch solche von Kartoffel, Koniferensämlingen, Rebsämlingen und Cereus herangezogen (siehe Tab. 1).

Bei den Stämmen von Cereus und Rebsämlingen, die im Gewächshaus bzw. im Mistbeetkasten aufgetreten waren, bestand zunächst Zweifel, ob es sich nicht um Vertreter des Vermehrungspilzes M o n i l i o p s i s A d e r -

Tabelle 1. Übersicht über die verwendeten Rhizoctoniastämme.

Nr.	Wirtspflanze	Krankheit	Herkunft
4959	Lupinus angustifolius	Wurzelfäule (Gewächshaus)	Berlin-Dahlem, April 1933
5017	„ luteus	Fußkrankheit	„ „ Juli 1933
5020	„ angustifolius	„	„ „ Aug. 1933
5021	„ „	Wurzelhalsfäule (Hypochnusstadium)	„ „ Aug. 1933
4958	Kartoffel	Grind der Knollen	„ „ Herbst 1932
4166	Koniferensämling	Umfallkrankheit	Gießen, Juni 1930
4892	Cereus	Fußfäule (Gewächshaus)	Weinböhla, Dezember 1932
4933 II	Rebsämling	Schwarzbeinigkeit (Mistbeetkasten)	Naumburg, März 1933
4933 IV	„	„	„ „ 1933

holdi Ruhl. handelt, den ja Müller[1]) für eindeutig von Rhizoctonia solani unterscheidbar hält. Da morphologisch keinerlei Verschiedenheiten festzustellen waren, wurde der Einfluß der Temperatur auf das Myzelwachstum geprüft, den Müller als auffallendes Unterscheidungsmerkmal anführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 4 graphisch dargestellt. Auf der Abszisse sind die Temperaturen, auf der Ordinate die Durchmesser der entwickelten Pilzkolonien in Millimeter abgetragen. Da die Myzelbildung in den niederen Temperaturen sehr langsam vor sich ging, wurde die Auswertung erst nach 3 tägigem Wachstum vorgenommen. Als Nährsubstrat diente Kartoffelsaftagar. Der besseren Übersicht wegen sind nur 4 Kurven wiedergegeben worden. Die Kurven der restlichen 5 Pilzstämme liegen so dicht bei denen der Lupinenstämme 4959 und 5017, daß sie praktisch als gleich zu bewerten sind. Es zeigte sich, daß alle geprüften Herkünfte ziemlich gleichartige Temperaturansprüche stellen. Die Minima liegen zwischen 5 und 6°, die Maxima nahe bei 35°, die Optima schwanken etwa zwischen 25 und 29° C. Auffällig ist, daß die Kurven der Stämme von Kartoffel und Cereus von den übrigen merklich abweichen. Dies ist aber nicht durch andere Temperaturansprüche bedingt, sondern es ist lediglich auf ein allgemein langsameres Myzelwachstum zurückzuführen. Es wird später gezeigt werden, daß diese beiden Stämme auch hinsichtlich ihrer Pathogenität gleichartig abweichen. Zunächst muß festgestellt werden, daß keiner der für die Untersuchungen verwendeten Pilzstämme Unterschiede zeigte, die seine Unterbringung in der Gattung Moniliopsis als M. Aderholdi gerechtfertigt hätte. Die verschiedenen Herkünfte sind also einheitlich als Rhizoctonia solani zu betrachten. Dabei erhebt sich allerdings wieder die Frage: Ist die Art Moniliopsis Aderholdi wirklich daseinsberechtigt oder handelt es sich bei dem Vermehrungspilz, wie ich annehme, nicht doch um Vertreter der Art Rhizoctonia solani, denen man bestenfalls die Eigenschaften von Varietäten oder Formen zugestehen könnte. Zur endgültigen Klärung dieser Frage müßten zweckmäßig möglichst viel Herkünfte verglichen werden.

[1]) Müller, K. O., Über die Beziehungen von Moniliopsis Aderholdi zu Rhizoctonia solani. (Arb. Biol. Reichsanst. f. Land- u. Forstw. Bd. 11. 1923. S. 321—325.)

Infektionsversuche.

Die Infektionen wurden in Topfversuchen im Gewächshaus durchgeführt, und zwar an Lupinus luteus, L. angustifolius und L. albus und an den Kartoffelsorten Aal, Erdgold und Maibutter. Als Kulturerde diente dem Untergrund entnommener, mäßig grober Sand, dem Reinkulturen der Pilzstämme zugesetzt waren. Die Pilze wurden zunächst auf sterilisiertem Gerstenschrot herangezogen, bis dieses gleichmäßig von den Pilzhyphen durchwachsen war. Dann erfolgte die Mischung der Infektionsmasse mit dem Sand und in diesem nach weiteren 5 Tagen die Aussaat. Die Samen, wie auch die Kartoffelknollen wurden vorher in Sublimat gebeizt und gut mit Wasser nachgewaschen.

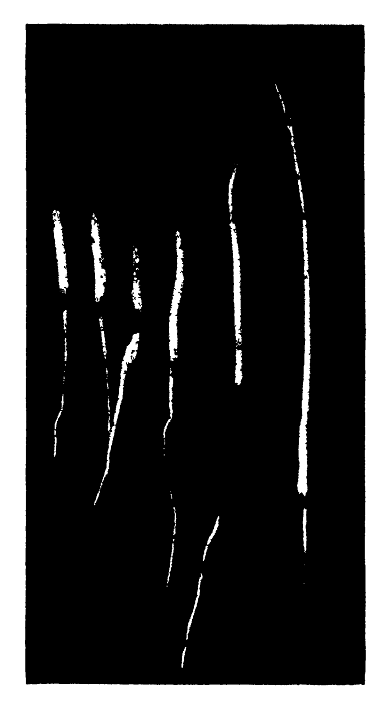


Abb. 5. Rhizoctonia-Schäden an Lupinus angustifolius durch künstliche Infektion mit Stamm Nr. 5020, rechts gesunde Pflanze.



Abb. 6. Sproßabtötung durch Rhizoctonia solani (Stamm Nr. 5020, künstliche Infektion) an Lupinus albus, rechts gesunde Pflanze.



Abb. 7. Keimlingssterben und Umfallkrankheit an Lupinus luteus durch künstliche Infektion mit Rhizoctonia solani (Stamm Nr. 5021), links Kontrolltopf.

Die Wirkung der Infektion zeigte sich bei der Lupine teilweise schon beim Auflaufen. Bei den stark pathogenen Stämmen wurden bereits die keimenden Samen befallen, so daß die noch nicht entfalteten Keimblätter eben noch die Bodenoberfläche erreichten und die Pflänzchen dann abstarben (Abb. 5). Verschiedentlich liefen die Samen normal auf, die Keimblätter entfalteten sich und waren selbst völlig unbeschädigt, aber der von ihnen eingeschlossene junge Sproß war von dem Pilze befallen und abgetötet, so daß sich die Pflanze nicht weiterentwickeln

konnte (Abb. 6). Ein weiterer Prozentsatz der Pflanzen wurde sehr bald fußkrank und fiel um (Abb. 7). Später traten dann die typischen rötlichbraunen Faulstellen an Wurzel und Wurzelhals auf.

An den Kartoffeln zeigte sich der Rhizoctoniabefall in der bekannten Weise als Fäulnis der unterirdischen Stengelteile. Gleichzeitig erschien auf den alten Knollen Sklerotienbildung. Die Pflanzen in den nicht infizierten Kontrolltöpfen blieben ausnahmslos gesund.

Tabelle 2.
Infektionsergebnisse mit Rhizoctonia solani an Lupine und Kartoffel.

Pilzstamm		Infektionen an Lupinen									Infektionen an 3 Kartoffelsorten		
		Lupinus luteus			Lupinus angustifolius			Lupinus albus					
Nr.	Herkunft	gesund	tot	Wurzelfäule	gesund	tot	Wurzelfäule	gesund	tot	Wurzelfäule	Aal	Erdgold	Maibutter
K	Kontrolle . .	12	—	—	20	—	—	20	—	—	—	—	—
K	Kontrolle . .	13	—	—	20	—	—	20	—	—	—	—	—
4959	Lupine . . .	2	10	1	1	17	2	—	10	10	—	—	—
5021	Lupine . . .	—	12	1	—	18	2	11	2	7	—	—	—
5017	Lupine . . .	4	6	3	3	6	11	12	2	6	—	—	—
5020	Lupine . . .				2	18	—	9	7	4	+ Scl.	(+) Scl.	— Scl.
4933 IV	Rebsämling .	1	7	5	—	19	1	1	15	4	—	—	—
4166	Koniferensämling . .	4	7	2	10	6	4	16	2	2	—	—	—
4933 II	Rebsämling .	10	1	2	4	6	10	12	4	4	(+) Scl.	— Scl.	(+) Scl.
4892	Cereus . . .	10	1	2	10	—	10	4	—	16	+ Scl.	+ Scl.	+ + Scl.
4958	Kartoffel . .	13	—	—	7	3	10	10	—	10	+ + Scl.	+ + Scl.	+ + Scl.

Die Zahlen bedeuten die Anzahl der Pflanzen. — = gesund; (+) = schwach befallen; + = stark befallen; + + = sehr stark befallen; Scl. = Sklerotienbildung auf der alten Knolle.

Zur Auswertung der Infektionsergebnisse (Tab. 2) wurden bei den Lupinen jeweils die gesunden, die völlig abgestorbenen und die wurzelfaulen Pflanzen ausgezählt. Bei den Kartoffeln wurde die Stärke der Schädigung durch Plus- und Minuszeichen dargestellt. „Scl." bedeutet, daß sich auf der alten Knolle Sklerotien des Pilzes gebildet hatten.

Die unterschiedliche Anfälligkeit der 3 Lupinenarten war zu schwankend, als daß sich daraus irgendwelche bedeutsamen Schlußfolgerungen ziehen ließen. Dagegen ist die verschieden starke Angriffskraft der einzelnen Pilzstämme sehr auffällig, besonders wenn man die Infektionsergebnisse an Lupine und Kartoffel gegenüberstellt. Um das Bild klarer zu gestalten, ist der Infektionserfolg in Abb. 8 nochmals in vereinfachter Form graphisch dargestellt worden. Dabei wurden die Ergebnisse der Infektionen an den 3 Lupinenarten einerseits und an den 3 Kartoffelsorten andererseits zusammengezogen. Es zeigt sich deutlich, daß die Pilzstämme, die die Lupine stark schädigen, die Kartoffel nicht angreifen. Umgekehrt wird die Lupine von den für Kartoffel stark pathogenen Stämmen nur schwach befallen. Eine Ausnahme machen nur der Stamm 5020 von Lupine und 4933 II von Rebsämling. Auffallend ist, daß der von Cereus isolierte Stamm 4892, der bereits hinsichtlich der Wachstumsgeschwindigkeit des Myzels Ähnlichkeit

mit dem Kartoffelstamm 4958 hatte (siehe Abb. 4), diesem auch in seiner Pathogenität gleicht. Es scheint also eine typische „Kartoffelform“ zu sein. Das unterschiedliche Angriffsvermögen der zu den Versuchen benutzten Pilzstämme an Lupine und Kartoffel ist nicht durch Virulenzunterschiede zu erklären, sondern es zeigt deutlich, daß hier biologische Rassen vorliegen,

Jnfektionsergebnisse an. Lupine Kartoffel

Kontrolle
Kontrolle
4959 Lupine
5021 Lupine
5017 Lupine
5020 Lupine
4933[IV] Rebsämling
4166 Koniferensamling
4933[II] Rebsamling
4892 Cereus
4958 Kartoffel

= gesunde Pflanzen gesund
= wurzelfaule Pflanzen schwach befallen
= tote Pflanzen stark befallen

Abb. 8.

was schon Braun[1]) in seiner Monographie über den Wurzeltöter der Kartoffel (S. 85) zum Ausdruck bringt: „Zusammenfassend können wir feststellen, daß an dem Vorkommen biologischer Rassen innerhalb der Spezies R. solani nicht gezweifelt werden kann“.

Zusammenfassung.

Es wird eine Fußkrankheit und Wurzelfäule der Lupinen, verursacht durch Rhizoctonia solani K., beschrieben und durch Infektionsversuche bewiesen. Kreuzinfektionen an Lupine und Kartoffel zeigten deutlich, daß der Pilz biologische Rassen bildet. Es spricht sehr viel dafür, daß der Vermehrungspilz, Moniliopsis Aderholdi Ruhl., mit Rhizoctonia solani identisch ist.

[1]) Braun, H., Der Wurzeltöter der Kartoffel Rhizoctonia solani K. Monographien zum Pflanzenschutz Nr. 5. Berlin (Verl. Springer) 1930.

Cylindrocarpon Fungus Studies.

By **Otto A. Reinking.**

With 2 figures in the text.

A study of the distribution of species of Cylindrocarpon in the soils of tropical Central and Northern South America indicated that five different organisms apparently were rather common soil fungi. Detailed investigations and comparisons with type cultures showed that two were new to science. One, Cylindrocarpon janthothele var. minus = Nectria mammoidea var. minor, readily produces perithecia and ascospores under temperate zone environment, but in the tropics did not produce the perfect stage after two years in culture. Since this fungus produces no chlamydospores and has a Nectria as perfect stage, it belongs to Section Ditissima of Cylindrocarpon. The second organism, Cylindrocarpon olidum var. suaveolens, produces chlamydospores in abundance and up to the present never has been observed to form a perfect stage. It belongs to Section Chlamydospora of Cylindrocarpon. The economic importance of these fungi has not been determined.

The studies were conducted from September 1931 to August 1932 in the lowland banana regions of Honduras, Guatemala (West Coast), Costa Rica, Panama and Colombia, Central and South America. The writer is indebted to Dr. H. W. Wollenweber for access to type cultures and assistance in these studies. Pure cultures of the Cylindrocarpon fungi have been deposited with the Centraal Bureau voor Schimmelcultures, Baarn, Holland.

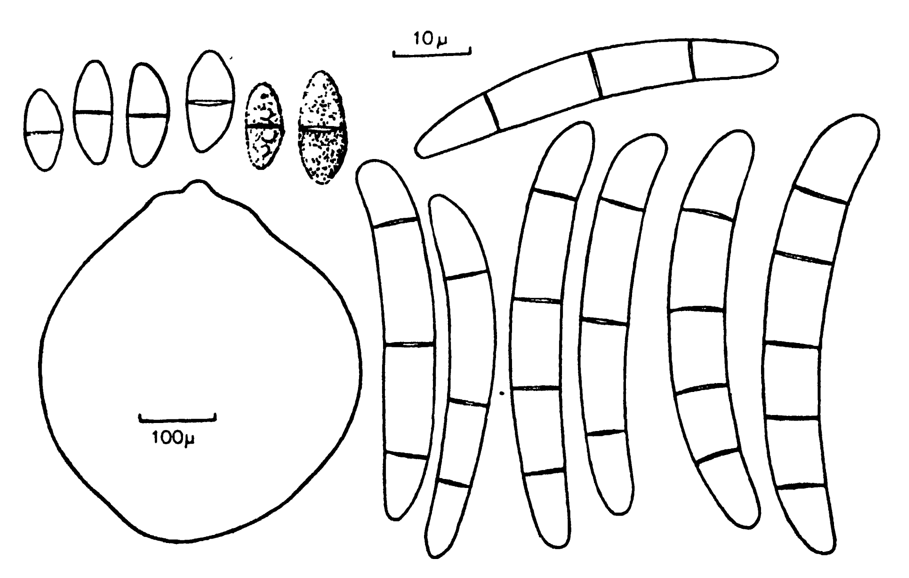


Fig. 1. Cylindrocarpon janthothele v. minus = Nectria mammoidea v. minor. **Ascospores, perithecium and conidia.**

Cylindrocarpon.

Sectio Ditissima Wr. in Ann. mycol. Vol. 15. 1917. p. 56.

Cylindrocarpon janthothele Wr.[1]) var. minus n. v. (Fig. 1).

Aërium mycelium sparsum albidum colore rubro-violaceo stromatis plus minusve plectenchymici expansi, plani vel sclerotialis convexi erumpentis libenter tinctum conidia format praesertim in pionnote sporodochiisque primo rubro-violaceis sicco atro-rubri coloris; microconidia ovoidea vel piriformia omnino rara, vulgo continua, macroconidia subcylindrica leviter curva, inaequilatere, utrinque ellipsoidea v. basi obtuso-conica, 3—(3—5), raro 6—7—septata.

0 — sept.	9 × 4.0 μ				1%
1 — sept.	32 × 5.8 μ				
3 — sept.	47 × 6.3 μ	plerumque	43—52 × 5.7—7.2	(36—58 × 5.3—7.8) μ	74%
4 — sept.	55 × 6.8 μ	,,	50—57 × 6.3—7.4	(49—62 × 6.3—7.5) μ	18%
5 — sept.	57 × 7.0 μ	,,	50—62 × 6.5—7.3	(50—64 × 5.8—7.5) μ	7%
6 — sept.	53 × 5.8 μ	,,	52—54 × 5.8—5.8		
7 — sept.	52 × 5.8 μ	,,			

Chlamydosporae absunt.

Habitat in humo plantarium Musae sapientum in Honduras, Costa Rica, Panama, Americae centralis (leg. O. A. Reinking. Sept. 1931 ad Apr. 1932).

Obs. Fungus a typo differt praesertim conidiis parum crassioribus.

Status perfectus huius fungi est:

Nectria mammoidea Phil. et Plowr. v. minor n. v. (Fig. 1).

Perithecia sparsa vel numerosa interdum caespitosa e globoso-ovoidea ad apicem applanata, papillata, glabra, coccineo-purpurea 0,47×0,43 (0,44—0,57×0,37—0,53) mm. Asci cylindracei, octospori, monostichi; sporidia ovoidea v. ellipsoidea, obscure subrugulosa, in massa pallida vel albo-incarnata, 1-septata 12×4,8 plerumque 11,5—13×4,6—5,9 (9—15,5×3,8—7) μ.

Habitat in humo plantarium Musae sapientum in Honduras, Costa Rica, Panama Americae centralis (leg. O. A. Reinking Sept. 1931 ad Apr. 1932).

Obs. A typo[2]) recedit sporidiis minoribus et conidiis parum brevioribus. Fungus humicola zonae ustae in orbem mediam importatus in culturis puris libenter perithecia formavit quae in America centrali adhuc non observata sunt.

Sectio Chlamydospora Wr. in Ann. mycol. Vol. 15. 1917. p. 56.

Cylindrocarpon olidum Wr.[3]) var. suaveolens n. v. (Fig. 2).

Mycelium aërium sparsum ex albo pallide incarnatum stroma tegens plus minuve plectenchymicum argillaceum, umbrinum vel sordide olivaceum, libenter conidia format instrata aut in sporodochiis pionnoteque accumulata, in massa ex albo pallide-incarnata, dein albo-cinnabarina, denique aureo-ochroleuca. Microconidia ovoidea continua rarius 1—2—septata, instrata;

---

[1]) Wollenweber, H. W., Ann. mycol. Vol. 15. 1917. p. 56; Fus. del. 472; Angew. Botanik. Bd. 8. 1926. S. 191, Taf. IV, 38; Zeitschr. f. Paras. Bd. 1. 1928. S. 160; Fus. del. 59; 526; 527; 1073.

[2]) Wollenweber, H. W., Zeitschr. f. Paras. Bd. 1. 1928. S. 161; Fus. del. 739—743; 1074.

[3]) Wollenweber, H. W., Ann. mycol. Vol. 15. 1917. p. 29, 56; Fus. del. 471; 653; 1087; Zeitschr. f. Paras. Bd. 1. 1928. S. 167.

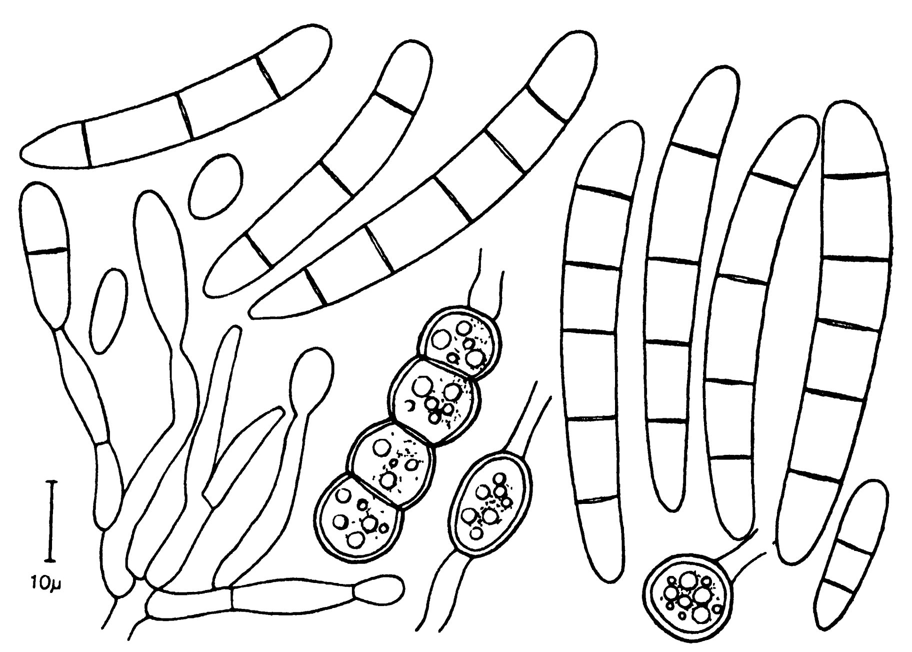


Fig. 2. Cylindrocarpon olidum v. suaveolens. Conidiophore, microconidia, macroconidia and chlamydospores.

macroconidia subcylindrica, interdum inaequilatere, leviter curva utrinque ellipsoidea vel basi obtuso-conica, 3—5—, rarissime 6—7—septata.

0 — sept.	10 × 4.3	plerumque	9—11 × 3.6—5.1	(8—14 × 3.5—6.3)	μ	9%
1 — sept.	18 × 4.8	,,	16—33 × 4.7—7.0	(13—33 × 4.3—7.0)	μ	1%
2 — sept.	26 × 5.4	,,	24—36 × 5.3—6.0	(20—36 × 4.5—6.0)	μ	1%
3 — sept.	43 × 7.3	,,	36—50 × 6.2—8.4	(28—59 × 5.3—9.0)	μ	21%
4 — sept.	55 × 7.5	,,	49—61 × 6.8—8.1	(45—68 × 6.5—8.8)	μ	30%
5 — sept.	60 × 7.8	,,	53—69 × 6.8—8.9	(48—74 × 6.5—9.3)	μ	36%
6 — sept.	74 × 7.8	,,	62—79 × 7.6—9.3	(62—80 × 7.3—9.3)	μ	2%
7 — sept.	54 × 7.8	,,	54—54 × 7.8—7.8			

Chlamydosporae numerosae terminales vel intercalares glabrae, globosae aut ellipsoideae, 0—1—septatae vel catenulatae, 0—septatae 12×10 (9—15×7—14), 1—sept. 18×11 (15—21×9—13) μ. Fungus in culturis puris vulgo Carum olit.

Habitat in humo plantarium Musae sapientum in Honduras, Costa Rica, Panama, Americae centralis (leg. O. A. Reinking, Sept. 1931 ad Apr. 1932).

Obs. A typo recedit conidiis brevioribus et odore suavi.

Cylindrocarpon-Isolations from Tropical Soils.

By Otto A. Reinking.

Introduction.

The importance of the Cylindrocarpon group of fungi from a pathological standpoint is gradually becoming more evident. A review of the literature on diseases caused by these fungi does not give a clear idea of their importance as a number of Cylindrocarpons are still included under other groups of fungi such as Ramularia and Fusarium. Cylindrocarpon fungi have been isolated from rotted roots, underground stems, fruits, stems and branches of various plants (4) (10) (11) (12) (13) (14) (15). In the majority of cases their pathogenicity has not been established. Some, however, have been shown to be distinctly parasitic and to cause destructive diseases (2) (4) (10) (13).

Cylindrocarpon mali (Nectria galligena) is the cause of a serious canker, die back, core rot and general fruit rot of apple and pear in Europe, England, Scandinavia, United States and other countries (1) (4) (10) (14). Cylindrocarpon Willkommii with varieties (Nectria ditissima with varietie) (3) and C. candidum with varieties (Nectria coccinea with varieties) cause a canker of various trees in Europe (10). Cylindrocarpon radicicola has been proved to be the cause of a decay of Narcissus roots and Lilies in Holland (2) (13). It has been isolated from a number of plants and may be, along with forms, the cause of various root troubles. This fungus and C. didymum have been reported as being present in the soil (11). The soil distribution of the various Cylindrocarpon fungi however, has not been determined.

During an investigation of soil-fusaria occurring in the soils of banana plantations in the Caribbean regions of Central and South America, the writer encountered various species of Cylindrocarpon. These fungi were collected for final identification and determination of the approximate number per gram of soil in the various soil types under investigation. The isolation of Cylindrocarpon, in these studies was of necessity secondary to the main problem. It may have been that not all of the representatives of this group present in the soil, nor the exact count per gram of soil, were obtained. It is believed, however, that the present studies give an idea of the relative abundance of the various species and varieties collected. The data, therefore, is presented to enlarge upon our knowledge of the distribution of the Cylindrocarpon fungi.

The studies were conducted from December 1930 to August 1932 in the lowland banana region of Honduras, Guatemala (Pacific Coast), Costa Rica, Panama and Colombia, Central and South America.

Materials and Methods.

The various soil types from which the investigations were made have been described fully in previous investigations (5) (6) (8) (9).

The Cylindrocarpon isolations were made from soils planted to bananas.

All soil samples were collected in paper sacks under controlled circumstances. In Honduras and Guatemala each surface sample was collected from an area comprising some one hundred square feet. The surface samples comprised a composite collection of the top one-half to one inch of soil. One sample was taken from each individual square so that twenty five isolations were conducted over the surface. In Costa Rica and Panama, the samples were taken from an area containing some twenty square feet that was divided into five squares, each containing four square feet. Five separate isolations were made from each twenty square foot area. The Colombia soil samples were a composite of the top six inches of soil of each area investigated. Only one isolation was made from each soil type. Depth soil isolations were conducted in Honduras and Guatemala. Isolations were made at each one inch depth to twenty four inches.

Throughout the investigation, the dilution method was used for isolations generally on the basis of a dilution of 1/50 and 1/250. The number of fungi determined in all soil types were calculated on the basis of the moist soils as collected, with a moisture content ranging from 10 to 30 percent. The media used was potato, dextrose agar that was acidified at the time of isolation in the petri dishes. A detailed account of the method of isolation has been given previously under the Fusarium investigation (8).

Investigations and Results.

Cylindrocarpon Isolations.

The following five Cylindrocarpons were isolated from the tropical soils under investigation: Cylindrocarpon janthothele v. minus-Nectria mammoidea v. minor, C. radicicola, C. curvatum, C. olidum and C. olidum v. suaveolens.

Table 1. Average number of Cylindrocarpon per gram of soil in surface samples.

Name of organism	Honduras Soil Types: Guaymas Peat	Guaymas VFSL	Guaymas C 34%	Guaymas C 41%	Quebrada Seca FS	Quebrada Seca C 37%	Progreso SCL	Progreso C 33%	Progreso C 46%
C. janthothele v. minus = Nectria mammoidea v. minor	20	2	20	—	—	—	—	—	—
C. curvatum . . .	—	—	—	—	—	—	10	—	—
C. olidum v. suaveolens	20	20	60	80	60	10	15	25	20
C. olidum	40	80	—	20	50	40	20	30	10

Name of organism	Guatemala Soil Types: Los Angeles C 41%	Tiquisate SC	Tiquisate SCL	Costa Rica Soil Types: Bearesem C + 50%	Estrella C 40–50%	Monte Cristo FS	Panama Soil Types: Changuinola C 45%	Sixaola C + 50 —55%	Colombia Soil Type: Tucurinca SCL
C. janthothele v. minus = Nectria mammoidea v. minor	—	—	—	10	10	10	—	10	—
C. curvatum . . .	—	—	—	10	10	—	—	—	75
C. olidum v. suaveolens	10	20	20	—	—	—	10	—	50
C. olidum	—	—	—	—	—	—	10	30	—

Surface Soil Isolations.

The average number of Cylindrocarpon fungi per gram of soil in surface samples isolated in Honduras, Guatemala, Costa Rica, Panama and Colomba are presented in table number 1.

According to the data given, C. olidum v. suaveolens, C. olidum and C. janthothele v. minus were the most wide spread. C. olidum v. suaveolens was isolated from the soils of all countries except Costa Rica. It was found at the rate of 10 to 80 per gram of surface soil and was present in practically all of the soil types in each country. C. olidum was isolated in soils of Honduras and Panama in approximately the same number in each soil type. C. janthothele v. minus was present in the soils of Honduras, Costa Rica and Panama, but evidently was not so widespread as the two former. C. radicicola was not isolated from the surface soils. It evidently grows better within the soil. C. curvatum was isolated only in low numbers from Honduras, Costa Rica and Colombia.

Depth Soil Isolations.

Depth soil isolations were conducted from various soil types in Honduras and Guatemala. Table 2 gives the average number of Cylindrocarpon fungi per gram of soil isolated at different depths.

It is interesting to note that, according to the data presented, all five fungi were isolated from the soil at varying depths of from 1 to 23 inches. C. olidum v. suaveolens and C. olidum were most widely distributed throughout the soil depths. The first named organism was most commonly isolated and at a rate of 10 to 938 per gram of soil. C. olidum was the next most widely distributed through the soil. C. radicicola was isolated only from the soil depth and was evidently present throughout the soil depth between 5 and 23 inches. The other two fungi were isolated rarely from a soil depth ranging from 3 to 21 inches.

Discussion.

Three of the five Cylindrocarpons isolated from tropical soils are common types frequently reported from Europe (10) (11). C. olidum v. suaveolens and C. janthothele var. minus are new varieties of well known European fungi (7) (11). The later fungus readily produces perithecia and ascospores under temperate zone conditions, but in the tropics did not produce the perfect stage after two years in culture. Cylindrocarpon radicicola apparently is the most cosmopolitan of the fungi isolated as it has been reported from a variety of hosts and from the soil in Europe, England, Australia and America (11).

Judging from the frequency of isolation from surface and depth soil samples, one would be led to believe that C. olidum v. suaveolens, C. olidum and C. janthothele v. minus are soil organisms. C. radicicola and C. curvatum were less frequently encountered, but as both fungi were found in the soil down to a depth of 21 to 23 inches they also undoubtedly are soil fungi. Types of the latter two organisms

Table 2. Average number of Cylindrocarpon per gram of soil isolated at different depths.

Depth in Inches	Honduras Soil Types						Guatemala Soil Types	
	Guaymas VFSL	Quebrada Seca FS	Quebrada Seca C 37%	Progreso SCL	Progreso C 33%	Progreso C 46%	Los Angeles C 41%	Tiquisate SC
Cylindrocarpon janthothele v. minus = Nectria mammoidea v. minor.								
3	—	—	—	—	63	—	—	—
9	—	—	—	—	10	—	—	—
Cylindrocarpon radicicola.								
5	10	—	—	—	—	—	—	—
6	125	—	—	—	—	—	—	—
13	25	—	—	—	—	—	—	—
14	—	—	63	—	—	—	—	—
20	10	—	—	—	—	—	—	—
21	10	—	—	—	—	—	—	—
23	10	—	—	—	—	—	—	—
Cylindrocarpon curvatum.								
13	10	—	—	—	—	—	—	—
14	—	—	—	—	25	—	—	—
21	—	—	—	63	—	—	—	—
Cylindrocarpon olidum v. suaveolens.								
1	10	—	—	63	—	63	—	250
2	—	—	—	—	50	—	—	938
3	25	—	—	—	63	—	—	—
5	10	—	—	—	—	313	—	—
6	—	—	—	—	63	—	—	
7	10	—	—	—	—	—	—	—
9	10	—	—	—	—	—	—	—
10	—	—	—	563	—	—	—	—
11	10	—	—	63	10	—	125	—
12	—	—	—	63	—	—	63	—
13	10	—	—	—	—	—	—	—
14	—	—	63	—	—	—	—	—
15	—	—	—	—	—	—	—	63
19	—	—	—	—	25	—	—	—
20	—	—	—	—	63	—	—	—
21	—	—	63	—	—	—	—	—
Cylindrocarpon olidum.								
1	—	—	—	—	35	63	—	—
2	10	—	—	—	—	125	—	—
3	—	—	—	—	10	125	—	—
4	—	—	—	—	10	—	—	—
6	—	—	—	—	10	—	—	—
7	—	—	—	—	10	—	—	—
10	—	—	—	63	—	—	—	—
11	—	—	—	63	—	—	—	—
12	—	—	—	63	10	—	—	—
13	25	—	—	—	10	—	—	—
15	—	—	—	63	—	—	—	—
16	—	—	—	—	—	63	—	—
18	—	63	—	—	—	—	—	—
21	—	—	—	63	—	—	—	—
23	10	—	—	—	—	—	—	—

in Europe are pathogens, the first named on Narcissus and Lilie, and the latter on apple (2) (12) (13).

Since all isolations in the tropics were made about banana plants the presence of this plant may have had a bearing on the number and distribution of the fungi. Wether or not the Cylindrocarpons isolated from tropical soils have any pathological significance can be stated only after inoculation studies have been made. They apparently are all common soil inhabitants that may have some bearing on soil decomposition.

No significant difference was found in the numbers per gram of soil in the different soil types. Apparently the soil types have no influence on the development of the fungi isolated. The present studies, therefore, are primarily of interest in that they enlarge upon our knowledge of the distribution of various Cylindrocarpon fungi.

Summary.

The following Cylindrocarpon fungi were isolated from the soil in the lowland banana regions of Honduras, Guatemala (West Coast), Costa Rica, Panama and Colombia, Central and South America: Cylindrocarpon janthothele v. minus-Nectria mammoidea v. minor, C. radicicola, C. curvatum, C. olidum and C. olidum v. suaveolens.

Those most widely distributed, in the order as listed were Cylindrocarpon olidum v. suaveolens, C. olidum, C. janthothele v. minus, C. curvatum and C. radicicola.

The various species of Cylindrocarpon isolated were present in the surface soil, with the exception of C. radicicola, and in the soil depth down to some 23 inches.

Apparently all of the species of Cylindrocarpon isolated are soil inhabitants. Their significance from a plant disease standpoint was not investigated.

The present studies are of interest in that they enlarge on our knowledge of the distribution of Cylindrocarpon fungi.

Literature cited.

1. Dillon Weston, W. A. R., A preliminary note on the perithecia of Nectria galligena. (Ann. of Appl. Biol. Vol. 12. 1925. p. 398.) — 2. Feekes, F. H., Onderzoekingen over Schimmelziekten van Bolgewassen. Doctors Thesis. Rijks University, Utrecht. Baarn, N.V. Hollandia Drukkerij. 1932. 93 S. — 3. Ferdinandsen, C., Über einen Angriff von Krebs (Fusarium Willkommii Lindau) an Apfel- und Birnenfrüchten. (Angew. Botanik. Bd. 4. 1922. S. 173—184.) — 4. Moore, M. H., Some field observations on apple canker (Nectria galligena). (Ann. Rept. East Malling Res. Stat. 1st Jan. 1933 to 31st Dec. 1933. p. 166—175. 1934.) — 5. Reinking, O. A., Parasitic and other Fusaria counted in Costa Rica and Panama soils. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 90. 1934. S. 4—17.) — 6. Reinking, O. A., Soil and Fusarium diseases. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 91. 1935. S. 243—255.) — 7. Reinking, O. A., Cylindrocarpon Fungus Studies. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 94. 1936. S. 134—136.) — 8. Reinking, O. A., and Manns, M. M., Parasitic and other fusaria counted in tropical soils. (Ztschr. f. Parasitenkunde. Bd. 6. 1933. S. 23—75.) — 9. Reinking, O. A., and Manns, M. M., Parasitic and other fusaria counted in Colombia soils. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 89. 1934. S. 502—509.) — 10. Richter, H., Die wichtigsten holzbewohnenden Nectrien aus der Gruppe der Krebserreger. (Ztschr. f. Parasitenkunde. Bd. 1. 1928. S. 24—75.) — 11. Wollenweber, H. W., Über Fruchtformen der krebserregenden Nectriaceen. (Ztschr. f. Parasitenkunde. Bd. 1. 1928. S. 138—173.) — 12. Wollenweber, H. W., Fusarium-Monographie. Fungi parasitici

et saprophytici. (Ztschr. f. Parasitenkunde. Bd. 3. 1931. S. 269—516.) — 13. Van Hell, W. T., Onderzoekingen over ziekten van Lelies. Doctors Thesis. Rijks University, Utrecht. Baarn, N.V. Hollandia Drukkerij. 1931. 116 S. — 14. Zeller, S. M., European canker of Pomaceous fruit trees. (Oregon Agr. Exp. Sta. Bul. 222. 1926.) — 15. Wollenweber, H. W. u. Reinking, O. A., Die Verbreitung der Fusarien in der Natur. Berlin, Friedländer u. Sohn. 1935. S. 75, 76, 79.

Vergleichende Betrachtung verschiedener Böden über Keimgehalt, Stickstoffbindung und Salpeterbildung[1]).

[Aus dem Institut für landwirtschaftliche Bakteriologie und Bodenkunde der Universität Leipzig.]

Von **Otto von Metzen.**

Mit 11 Abbildungen im Text.

Einleitung.

Der Grundcharakter jedes Bodens ist von der Natur gegeben. Veränderungen können daher nur innerhalb bestimmter Grenzen auftreten. So können beispielsweise der Humusgehalt, die Reaktion, die physikalische Struktur und der Nährstoffgehalt schwanken. Da solche Schwankungen häufig durch die Tätigkeit der Mikroorganismen mitbedingt sind, ist eine Kenntnis der Kleinlebewelt des Bodens und ihrer Tätigkeit für seine Kennzeichnung notwendig. Die Umsetzungen der verschieden zusammengesetzten Mikroflora sind sehr vielseitig, so daß es nicht möglich ist, sie mit einer einzigen Methode zu erfassen. Bei der Erforschung besonders wichtiger Umsetzungen sind daher Sonderuntersuchungen nötig, die möglichst unbeeinflußt von anderen, womöglich antagonistischen Umsetzungen durchgeführt werden können. Mehr noch als bei chemischen Vorgängen ist bei der Untersuchung mikrobiologischer Vorgänge eine strenge Kontrolle der angewandten Methode unerläßlich, da hierbei die Zahl der bestimmenden und beeinflussenden Faktoren stets größer ist. Eine Kenntnis dieser Faktoren und die ihrer gegenseitigen Wechselbeziehungen sind daher in erster Linie notwendig.

Bei der Beurteilung und Auswertung der Ergebnisse ist ferner zu berücksichtigen, daß einmalige Untersuchungen häufig kein eindeutiges Bild zu geben vermögen. Außerdem ist Wert darauf zu legen, daß die angewandte Methode neben dem Endwert eines mikrobiologischen Vorganges Aufschluß gibt über den Entwicklungsverlauf der einzelnen Umsetzungen.

Die Wirkung verschiedener Bodenbeschaffenheit, Bodenart und Düngung auf mikrobiologische Umsetzungen und Vorgänge, im besonderen auf Zahl und Tätigkeit der Mikroben, ist in früheren Arbeiten schon öfter untersucht worden. Das Gesamtergebnis dieser Arbeiten ist nicht einheitlich gewesen. Insbesondere darf ein derartiges Studium sich nicht darauf beschränken, die Veränderungen festzustellen, die hierbei auftreten können, sondern es hat darüber hinaus, und das ist vielleicht das wichtigste, die Gründe zu erörtern, die die Änderungen bewirken. In vorliegender Arbeit wurden im besonderen Keimgehalt, Stickstoffbindung und Salpeterbildung in verschiedenen, stark voneinander abweichenden Bodentypen berücksichtigt.

[1]) Erschienen als Dissertation der Philosophischen Fakultät der Universität Leipzig.

I. Allgemeine Methodik der Untersuchungen.

1. Die Versuchsböden.

a) Lage.

Für die Versuche wurden 3 Sandböden, 3 Lehmböden und 3 Moorerden verwendet, die in Struktur, p_H-Werten, Düngung und Ernteergebnissen starke Verschiedenheiten aufwiesen. Die 9 Böden waren (1926) in Betonkästen eingelagert worden, die 1 cbm faßten und 1 m tief waren. Diese Kästen befanden sich im Freien, waren unbedeckt und so den Einflüssen der Witterung ausgesetzt.

b) Düngung.

Je 3 der verschiedenen Boden wurden gleichmäßig behandelt. 3 Parzellen, also je eine Sand-, Lehm- und Moorerdeparzelle blieben ungedüngt (Reihe I), je 3 weitere waren lediglich gekalkt worden (Reihe II), 3 Parzellen der drei verschiedenen Bodenarten hatten schließlich außer der Kalkung eine basische Düngung bekommen (Reihe III).

Die 9 Böden waren folgendermaßen geordnet und bezeichnet:

Boden:	ungedüngt	gekalkt	gekalkt und basisch gedüngt
Sandboden	1	4	7
Lehmboden	2	5	8
Moorerde	3	6	9
Reihe:	I	II	III

Reihe III hatte am 25. Sept. 1927 die erste basische Düngung erhalten. Es waren gegeben worden je

103 g $NaNO_3$ = 16,48 g N
100 g Thomasmehl = 14,48 g P_2O_5
60 g 42 proz. Kali = 25,20 g K_2O.

Am gleichen Tage waren Reihe II und III gekalkt worden.

Am 12. Mai 1928 hatte Reihe III wiederum eine basische Düngung erhalten. Es waren gegeben worden je

51,5 g $NaNO_3$ = 8,24 g N
50,0 g Thomasmehl = 7,24 g P_2O_5
30,0 g 42 proz. Kali = 12,60 g K_2O.

Am gleichen Tage war Reihe II wieder gekalkt worden.

c) p_H-Werte.

Die Ergebnisse der nach Trénel gemessenen p_H-Werte sind in Tab. 1 zusammengestellt.

Tabelle 1. Reaktion der Böden.

Boden	Daten der Probenahme			
	10. 5. 28	20. 10. 28	3. 7. 29	23. 11. 30
Sandparzelle 1	6,70	7,05	7,03	7,04
,, 4	7,06	7,50	7,53	7,61
,, 4	7,15	7,62	7,49	7,51
Lehmparzelle 2	7,14	6,77	6,49	6,34
,, 5	7,09	6,80	7,18	7,21
,, 8	7,15	6,99	7,43	7,41
Moorparzelle 3	3,06	3,02	3,00	2,90
,, 6	4,15	4,50	4,66	4,61
,, 9	4,03	4,40	4,31	4,30

Beim Vergleich der Werte fällt die hohe Wasserstoffionenkonzentration der drei Moorerden auf. Ferner ist deutlich zu sehen, daß die drei ungedüngten Parzellen 1, 2 und 3 im Versuchsjahre 1930 etwas saurer waren als die entsprechenden gekalkten und basisch gedüngten Parzellen der gleichen Bodenart. Dieser Unterschied ist stark bei den Moorerden, etwas schwächer bei den Lehm- und Sandböden.

d) Ernteergebnisse.

Im Jahre 1928 waren auf den 9 Parzellen Kartoffeln angebaut worden, im Jahre 1929 Hafer. 1930 — also während der Versuchszeit — waren die Parzellen unbebaut geblieben. Die Ernteerträge von 1928 und 1929 und die Verhältniszahlen der Erträge sind in Tab. 2 zusammengestellt.

Tabelle 2.

Ernte:	1928		1929	
Frucht:	Kartoffeln		Hafer	
	g Trs. je Parz.	Verhältn. W. (Parz. 8 = 100)	g Trs. je Parz.	Verhältn. W. (Parz. 8 = 100)
Sandparzelle 1	145	17,1	172	34,8
,, 4	200	23,5	113	22,9
,, 7	445	52,4	258	52,2
Lehmparzelle 2	575	67,8	323	65,4
,, 5	655	77,1	341	69,0
,, 8	850	100,0	494	100,0
Moorparzelle 3	255	30,0	78	15,1
,, 6	265	31,2	214	43,3
,, 9	555	65,4	590	119,4

Die Wirkung von Düngung und Kalkung auf die Ernteerträge ist im allgemeinen deutlich ersichtlich. Bei den Moorerden sind die Unterschiede der Hafererträge besonders stark. Die größere Säureverträglichkeit hat sich hier geltend gemacht. Bei den Lehm- und Sandböden sind die Ertragsunterschiede etwas ausgeglichener, die Reaktion hat hier nicht so eindeutig gewirkt. Pflanzenkrankheiten sind nicht beobachtet worden.

e) Strukturverschiedenheiten.

Interessant war die Beobachtung, wie die verschiedene Düngung und Höhe der Ernten die ursprünglich übereinstimmenden Böden gleicher Bodenart Veränderungen unterworfen hatten, die sich besonders in den Strukturverschiedenheiten und dem sehr unterschiedlichen Verhalten gegenüber den Witterungseinflüssen äußerten.

Innerhalb der Gruppe der Moorerden zeigten sich die größten Extreme. Die basisch gedüngte Moorerde von Parz. 9 wies eine stark krümelige Struktur auf, eine Klumpenbildung konnte nur bei stärkerer Nässe beobachtet werden. Die Luftzufuhr zu den unmittelbar unter der Oberfläche liegenden Schichten war stets gut, und der Boden wurde durch die im Versuchsjahre 1930 unmittelbar aufeinanderfolgende große Trockenheit und starke Nässe nicht nachteilig verändert. Trotz seines verhältnismäßig hohen Wassergehaltes schien er gegen große Trockenheit empfindlicher zu sein als gegen starke Nässe. Nach Beendigung längerer Regenzeiten zeigte er bald wieder eine gute, krümelige Struktur. Rege mikrobiologische Tätigkeit hatte dafür gesorgt, daß die organischen Reste von Pflanzen, speziell der Haferwurzeln, meist gut zersetzt waren. Die Farbe der Erde war schwarzbraun. Die Moorerde von Parz. 6 wies ähnliche Eigenschaften auf, nur zeigte sie bei starker Nässe Neigung zum Verschlämmen, die Struktur war ungünstiger. Die Zersetzung organischer Pflanzenreste war längst nicht in demselben Maße fortgeschritten wie in Parz. 9. Der Grund hierfür dürfte in der geringeren und ungeregelteren Luftzufuhr und der damit zusammenhängenden geringeren Tätigkeit der Mikroorganismen zu suchen sein. Die Erde fühlte sich auch nach längeren Trockenzeiten stets etwas feucht an im Gegensatz zur Erde von Parz. 9, die in diesem Falle eher der Gefahr einer zu starken Austrocknung ausgesetzt war. Die Farbe der Moorerde von Parz. 6 war mehr schwarz als bräunlich. Parz. 3 unterschied sich von den Parz. 6 und 9 wesentlich. Die tiefschwarze Erde war stets sehr feucht, beinahe naß, die Oberfläche immer leicht verschlämmt, sehr häufig konnten größere nasse, zusammenhängende Klumpen beobachtet werden. Die Pflanzenreste waren bis zum Abschluß der Versuche fast unzersetzt geblieben, was durch die unzureichende Luftzufuhr und die starke Nässe, vor allem aber durch die hohe Wasserstoffionenkonzentration bedingt war. Sogar die im Juni anhaltende große Trockenheit und Hitze hatte die Erde von Parz. 3 kaum verändert. Nur die Oberfläche der Moorerde wurde etwas

trockener, wodurch eine bessere Luftzufuhr zu den oberen Schichten bis zu etwa 12 cm Tiefe ermöglicht wurde. Abgesehen von dieser sehr trockenen Periode zeichnete sich die Erde von Parz. 3 immer durch starke Feuchtigkeit aus. Von allen 9 Böden hatte sie die ungünstigsten Vorbedingungen für Pflanzenwachstum und Bakterienleben.

Die Parz. 2, 5 und 8 enthielten Lehmböden mit stark tonigen Beimengungen und geringem Humusgehalt. Die 3 Böden wiesen in ihrer Struktur, ihren Eigenschaften und ihrem Verhalten gegenüber Witterungseinflüssen keine wesentlichen Unterschiede auf. Alle 3 Lehmböden waren sehr empfindlich gegen große Trockenheit und starke Nässe, am meisten der ungedüngte Boden von Parz. 2. Er neigte am ehesten zur Krusten- bzw. Klumpenbildung. Die schon erwähnte Trockenheit im Juni 1930 wirkte sich auf die obersten Bodenschichten der 3 Lehmböden sehr ungünstig aus, indem sie Veranlassung zur Bildung einer harten Kruste von etwa 5—10 cm gab. Die unmittelbar darauf folgende Nässe hatte eine ziemlich weitgehende Verschlämmung der Lehmböden zur Folge, die eine gute und ausreichende Luftzufuhr ebensowenig gestattete wie die Krustenbildung im Juni. Die Pflanzenreste waren bei Beginn der Versuche fast restlos zersetzt. Die Farbe aller drei Lehmböden in trockenem Zustande war übereinstimmend dunkelbraun.

Die Sandparz. 1, 4 und 7 waren humusarm und enthielten geringe Beimengungen lehmiger Bestandteile. Ihre geringe Fähigkeit, Wasser zu binden, benachteiligte sie bei großer Trockenheit gegenüber den anderen Böden teilweise sehr stark. Die einzelnen Bodenteilchen lösten sich dann vollständig voneinander, und die Sandböden wiesen eine pulvrige Struktur auf, besonders der Sand der ungedüngten Parz. 1. Die Pflanzenreste waren bei Beginn der Untersuchungen vollständig zersetzt. Die Farbe der Böden im getrockneten Zustande war sehr hell.

2. Niederschläge.

Das Versuchsjahr 1930 ist sehr extrem verlaufen. Starke Niederschläge und große Trockenheit wechselten in ziemlich rascher, oft unmittelbarer Folge. Die dadurch bedingten Veränderungen der Verhältnisse in den einzelnen Böden und die z. T. starken Schwankungen ihrer Wassergehalte haben auf den Verlauf der mikrobiologischen Umsetzungen in den Böden teilweise stark eingewirkt.

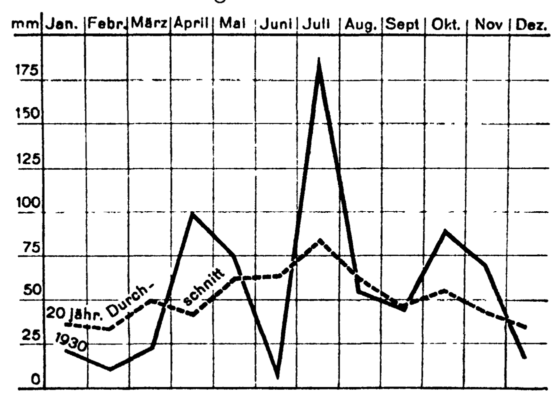


Abb. 1. Niederschläge.

Die monatlichen Niederschlagsmengen in den Jahren 1928—30 betrugen:

Monate	1928	1929	1930
Januar	36,5	42,2	21,1
Februar	32,7	27,2	11,9
März	37,1	18,0	24,3
April	51,8	30,3	99,6
Mai	61,3	51,5	76,2
Juni	42,0	62,9	11,1
Juli	42,0	49,0	186,5
August	56,3	43,4	55,2
September	18,9	18,1	46,9
Oktober	42,3	107,1	89,2
November	105,7	18,0	69,2
Dezember	53,2	57,9	17,2

Durchschn. d. letzten 20 Jahre: 38,1 35,1 51,2 43,2 62,0 64,7 84,9 61,9 48,0 56,3 43,9 37,9.

Wie sehr der Witterungsverlauf des Versuchsjahres vom durchschnittlichen Verlauf abweicht, zeigt die graphische Darstellung in Abb. 1.

3. Probenahme.

Die Proben der 9 Böden wurden unter sterilen Bedingungen aus 10 cm Tiefe entnommen. Jede Probe einer Parzelle stellte eine Mischprobe dar, die durch Entnahmen an 12 verschiedenen Stellen einer Parzelle zustande gekommen war. Die Mischung von 12 verschiedenen Einzelproben wurde vorgenommen, um evtl. örtliche Bodenverschiedenheiten innerhalb einer Parzelle auszugleichen — eine Maßnahme, die mit besonderer Rücksicht auf die Moorerden angebracht schien. Die Versuchsproben der 9 Böden dienten sowohl der Wassergehaltsbestimmung wie der biologischen Untersuchung. Die Entnahmen erfolgten regelmäßig um 11 Uhr, um nach Möglichkeit bei den Ergebnissen evtl. tägliche Schwankungen speziell des Keimgehaltes auszuschalten.

Da es technisch nicht möglich war, die vier Parallelen der 9 Böden nebeneinander in einem Arbeitsgange zu untersuchen, wurde im allgemeinen folgendes Schema eingehalten: Die Proben der 3 Sandböden wurden im ersten Drittel eines jeden Monats entnommen und untersucht, die der Lehmböden im zweiten, die der Moorerden im letzten Drittel. Eine größere Ausnahme von dieser Regel wurde im Juni gemacht, um nach Möglichkeit die Wirkung der Trockenzeit vom 4.—23. Juni 1930 auf sämtlichen Böden zu untersuchen und in dieser Hinsicht eine gemeinsame, vergleichende Betrachtung zu ermöglichen. Die Sandböden wurden aus diesem Grunde am 20. Juni erneut untersucht. Die Entnahme der Bodenproben zur Wassergehaltsbestimmung und zur biologischen Untersuchung erfolgte in den einzelnen Monaten an unten angeführten Tagen:

Monate	Sand	Lehm	Moor
Januar	4.	11.	24.
Februar	1.	16.	28.
März	5.	14.	18.
April	1.	11.	15.
Mai	2.	12.	19.
Juni	20.	21.	23.
Juli	8.	15.	21.
August	14.	22.	26.
September	13.	19.	20.
Oktober	3.	13.	20.
November	7.	10.	22.

4. Wassergehalt und Wasserkapazität.

Die starken Schwankungen der Niederschlagsmengen mußten auf den Wassergehalt der einzelnen Bodenproben deutlichen Einfluß ausüben. Entsprechende Bestimmungen brachten folgende Ergebnisse (Tab. 3):

Tabelle 3. Wassergehalt in Prozent des Bodengewichtes.

Monate	Sandböden			Lehmböden			Moorerden		
Parz.:	1	4	7	2	5	8	3	6	9
Januar	5,9	5,9	6,0	19,1	19,0	19,0	61,2	60,9	60,1
Februar	5,3	5,3	5,3	24,7	24,6	24,5	60,5	53,8	52,7
März	4,8	4,8	4,8	18,9	18,9	18,8	62,8	55,8	54,1
April	4,6	4,6	4,6	14,9	14,7	14,7	65,8	64,9	64,0
Mai	4,9	4,9	4,9	15,8	15,6	15,5	64,1	63,0	62,2
Juni	2,3	2,3	2,3	13,3	13,0	12,9	58,1	53,9	50,4
Juli	4,9	4,8	4,8	17,0	16,9	16,9	64,2	62,9	58,1
August	3,9	3,8	3,8	15,0	14,8	14,8	61,7	60,9	60,3
September	4,8	4,8	4,8	14,4	14,2	14,2	60,1	53,6	53,6
Oktober	4,3	4,3	4,3	16,4	16,2	16,2	61,0	58,1	57,4
November	5,1	5,0	5,0	15,2	15,2	15,2	62,8	60,1	59,8

Die dreiwöchige Trockenperiode vom 4.—23. Juni (0 mm) und die unmittelbar nachfolgende Nässeperiode vom 24. Juni bis 29. Juli 1930 (192,6 mm) drückten sich in den Ergebnissen der Wassergehaltsbestimmungen von Juni und Juli deutlich aus. Mit Ausnahme von Parz. 6 erreichten alle Böden im Juni ein Minimum. Die ermittelten Differenzen waren teilweise beträchtlich. Die Ergebnisse ließen ferner erkennen, wie verschieden die 3 Moorerden untereinander waren, während die geringen strukturellen Verschiedenheiten der Lehmböden bzw. Sandböden keine wesentlichen Unterschiede erkennen ließen. — Die nach Beendigung der Versuche gemessene Wasserkapazität betrug bei

Sandparzelle 1	23,18%
„ 4	23,18%
„ 7	23,18%
Lehmparzelle 2	36,89%
„ 5	36,89%
„ 8	36,89%
Moorparzelle 3	89,84%
„ 6	89,04%
„ 9	87,88%

5. Bodentemperaturen.

Die gleichzeitig bei der Entnahme angestellten Messungen der Bodentemperaturen wurden zwecks Erzielung vergleichbarer Ergebnisse stets zur selben Tageszeit, 11 Uhr, vorgenommen. Sie erfolgten in einer Tiefe von 10 cm, gingen der Probenahme unmittelbar voraus und ergaben folgendes Bild:

Tabelle 4. Bodentemperaturen in ° C.

Monate	Sandböden	Lehmböden	Moorerden		
Parz.:	1, 4 u. 7	2, 5 u. 8	3	6	9
Januar	4	3	3	3	3
Februar	3	1	0	1	1
März	2	0	6	7	7
April	7	9	8	8	8
Mai	12	15	12	12	13
Juni	22	21	17	19	20
Juli	16	16	15	17	18
August	17	18	15	16	16
September	14	15	11	11	12
Oktober	10	8	8	8	8
November	2	4	4	5	5

Bei den Temperaturmessungen konnten innerhalb der Gruppe der Sand- bzw. der Lehmböden keine meßbaren Unterschiede festgestellt werden. Unter den Moorerden war die ungedüngte Parz. 3 durchschnittlich 1—2°, im Juni und Juli sogar 3° tiefer als die beiden anderen Erden, die ziemlich übereinstimmende Bodentemperaturen aufwiesen. Allgemein bemerkenswert ist die starke Erwärmung aller Böden im Juni, besonders der Sand- und Lehmböden.

II. Bakteriologische Untersuchungen.

1. Keimzählungen.

Vom Januar bis November 1930 wurden von sämtlichen 9 Versuchsböden monatlich Keimzählungen durchgeführt.

Zur Anwendung kamen zwei Methoden:

1. die Plattengußmethode,
2. die Verdünnungsmethode.

Beide Methoden wurden nebeneinander durchgeführt. Als gemeinsames Ausgangsmaterial dieser Paralleluntersuchungen mit den 9 Böden dienten jeweils dieselben Bodenproben bzw. Bodenaufschwemmungen.

a) Plattengußmethode.

Methodik. 10 g lufttrockenen Bodens wurden in 1 l sterilisiertem Leitungswasser 1/4 Std. lang kräftig durchgeschüttelt. Ehe sich die aufgeschwemmten Bodenteilchen wieder absetzen konnten, wurde je 1 ccm der Aufschwemmung unter sterilen Bedingungen abpipettiert und mit 9 ccm sterilem Leitungswasser verdünnt (1 : 1000). Auf die gleiche Art wurden dann Verdünnungen bis zu 1 : 1 000 000 hergestellt. Von den Verdünnungen 1 : 100 000 und 1 : 1 000 000 wurde je 1 ccm in eine sterile Petrischale pipettiert, in die dann etwa 12 ccm eines vorher hergestellten Bodenextraktagars gegossen wurden. Um die Versuchsbedingungen möglichst einheitlich zu gestalten, wurde davon abgesehen, den Extrakt für die Versuche mit den 9 Böden aus diesen jedesmal selbst herzustellen. Vielmehr wurde der Bodenextrakt aus einer hier nicht untersuchten fruchtbaren Gartenerde gewonnen. Die Herstellung des Extraktes erfolgte im wesentlichen nach den Vorschriften von Löhnis (1), allerdings mit der Abänderung, daß die doppelte Bodenmenge zur Verwendung kam. Die erhöhte Konzentration des Bodenauszuges hat das Bakterienwachstum auf den Platten gefördert, neben schnellerem Wachstum stieg die Zahl der zählbaren Keime um 38%, und zwar handelte es sich vorwiegend um Mikroorganismen, die keine Sporen bildeten. Das Wachstum der Aktinomyzeten wurde im allgemeinen nicht gefordert. Ein im Oktober 1929 mit zwei verschiedenen Bodenextrakten durchgefuhrter Vorversuch brachte folgende Ergebnisse:

	Bodenextrakt			
	einfache Konzentr. (nach Löhnis)		doppelte Konzentr.	
	Keimzahl			
	Mill.	%	Mill.	%
Nichtsporenbildner . . .	13,0	44,7	20,5	50,9
Sporenbildner	13,2	45,4	18,6	41,8
Aktinomyzeten	2,5	8,6	2,8	7,0
Pilze	0,4	1,3	0,1	0,3
	29,1	100,0	40,2	100,0

Der günstige Einfluß des nährstoffreicheren Bodenextraktes auf das Bakterienwachstum geht aus diesem in je 10 Parallelen durchgeführten Vorversuch deutlich hervor.

Die Extraktion des Bodens wurde nicht, wie sonst üblich, im Autoklaven, sondern in stromendem Dampf vorgenommen. Die Ergebnisse eines in dieser Richtung im Oktober 1929 durchgeführten Vorversuches zeigten, daß der lediglich im Dampftopf sterilisierte Bodenauszug auf das Bakterienwachstum günstiger wirkte als der mit Hilfe des Autoklaven sterilisierte Extrakt.

	Bodenextrakt	
	einmal im Autoklaven unter 2 Atm. Druck sterilisiert	sterilisiert durch 3 mal. Erhitzen im Dampftopf auf 100° C
Sandparzelle 1	5,6 Mill. Keime	10,4 Mill. Keime
,, 4	4,0 ,, ,,	14,0 ,, ,,
,, 7	8,8 ,, ,,	13,6 ,, ,,
Lehmparzelle 2	12,8 ,, ,,	15,6 ,, ,,
,, 5	15,9 ,, ,,	26,0 ,, ,,
,, 8	16,0 ,, ,,	30,7 ,, ,,

Dem Extrakt wurden 0,05% Dikaliumphosphat, 1% Mannit und 1,5% Agar zugesetzt. Die für die Versuche mit Sand- und Lehmböden bestimmten Nährböden wurden mit Sodalösung neutralisiert. Der flüssige Nähragar wurde auf 50° im Wasserbade abgekühlt und dann sofort auf die in den Platten befindlichen verdünnten Bodenaufschwemmungen gegossen, durch häufiges Drehen gut durchgemischt und nach dem

Erkalten im Brutschrank bei 22° bebrütet. Bei jeder Untersuchung wurden 4 Parallelen angesetzt. Nach 6 Tagen wurde die Zahl der Kolonien auf den einzelnen Platten festgestellt, wobei für die Festsetzung der Ergebnisse nur die Platten bei der Zählung Berücksichtigung fanden, deren Koloniezahl sich zwischen 10 und 110 bewegte.

Versuchsergebnisse. Die in den einzelnen Monaten erzielten Keimgehalte sind in Abb. 2—4 graphisch dargestellt. Die daraus ersichtlichen Keimzahlen sind Mittelwerte aus 4 Parallelen.

b) Verdünnungsmethode.

Methodik. Das Ausgangsmaterial für die Versuche war auch hier wie bei dem Plattengußverfahren die Bodenaufschwemmung 1 : 100. Je 2 ccm dieser Aufschwemmung wurden jeweils in sterile Kölbchen überpipettiert, die 18 ccm der folgenden Lösung enthielten:

Pepton siccum Witte	1,00 g
Bodenextrakt.	100,00 ccm

Es wurden je vier Verdünnungen der Bodenaufschwemmung mit der oben erwähnten Peptonlösung im Verhältnis 1 : 10 000 000 und 1 : 100 000 000 hergestellt. Die Kolbchen wurden 3 Tage im Brutschrank bei 22° C bebrutet und danach ausgewertet. Die so ermittelten Werte sind in Tab. 5 zusammengestellt.

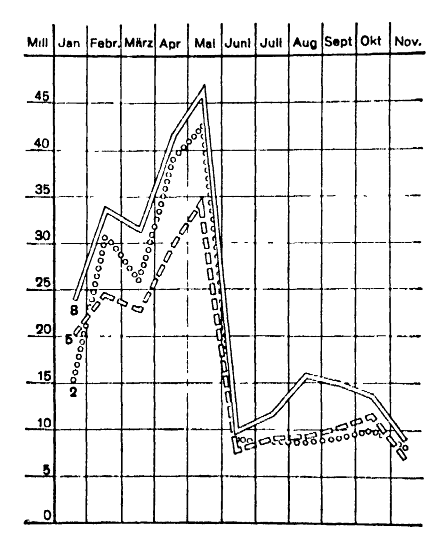


Abb. 2. Keimzahlen in Mill. je g Erde (Lehmböden).

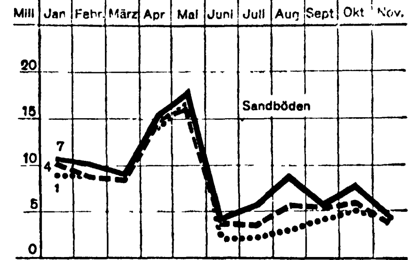


Abb. 3. Keimzahlen in Mill. je g Erde (Sandböden).

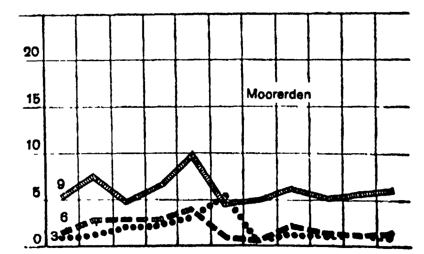


Abb. 4. Keimzahlen in Mill. je g Erde (Moorerden).

Tabelle 5. Keimzahl in Millionen je Gramm Erde.

Monat	Sandboden			Lehmboden			Moorerden		
Parz.:	1	4	7	2	5	8	3	6	9
Januar	7,5	10	10	25	50	50	2,5	7,5	10
Februar	10	7,5	25	25	50	75	5	7,5	10
März	10	7,5	25	25	75	75	7,5	10	10
April	25	10	50	50	75	100	7,5	10	25
Mai	10	10	50	75	75	100	5	10	25
Juni	5	7,5	25	50	50	75	10	10	10
Juli	10	10	25	50	50	75	5	7,5	10
August	25	25	50	75	75	100	5	5	10
September . . .	25	25	25	50	75	75	5	5	10
Oktober	10	10	25	50	50	50	2,5	2,5	10
November . . .	10	10	10	25	25	25	2,5	2,5	10

c) Vergleich beider Methoden.

Bei einem Vergleich beider Zählverfahren ist zu berücksichtigen, daß die Verdünnungsmethode um so zuverlässiger arbeitet, je größer die Zahl der Parallelen ist. Da hier nur 4 Parallelen angesetzt wurden, können die Ergebnisse nicht so genau sein, wie bei der Plattenmethode. Ferner ist darauf hinzuweisen, daß die Verdünnungsmethode gegenseitige Reizwirkungen der sich vermehrenden Bakterien ermöglicht, während auf der Platte in Ermangelung dessen unter Umständen Wachstumshemmungen auftreten können, die die Ausbildung sichtbarer und damit zählbarer Kolonien verhindert.

Das Verdünnungsverfahren gibt im großen und ganzen ein ähnliches Bild von den Schwankungen der Keimgehalte wie die Plattenmethode. Auch hier standen die Lehmböden vor den anderen. Die Sandböden und die basisch gedüngte Moorerde befanden sich ungefähr in der Mitte, während die beiden anderen Moorerden auch hier die geringsten Gehalte aufwiesen. Die Juniergebnisse machten auch bei Anwendung dieses Zählverfahrens eine Ausnahme. Die im Juni bei den Lehm- und Sandböden erfolgte Abnahme war hier ebenfalls wahrzunehmen.

Es ist nicht wahrscheinlich, daß die Ergebnisse der Verdünnungsmethode im August die tatsächlichen Vorgänge und die damit zusammenhängenden Keimgehalte wirklichkeitsgetreu widerspiegeln. Das nochmalige Ansteigen der Keimzahlen in den Lehm- und Sandböden war zu erwarten, aber keineswegs in dieser Höhe. Man kann kaum annehmen, daß die Keimzahlen der Mineralböden im Mai und August die gleichen waren. Auch kommt das durch die Trockenheit hervorgerufene Absinken der Keimzahlen im Juni durch die Verdünnungsmethode weniger deutlich zum Ausdruck. Unwahrscheinlich mutet das Fallen der Keimzahl von Parzelle 1 von April bis Mai von 25 auf 10 Mill. an, das vermutlich auf eine Unsicherheit der Methode zurückzuführen ist.

Kühlmorgen-Hille (2) hat bei einer vergleichenden Prüfung beider Methoden einen besonders harmonischen Verlauf der Ergebnisse beider Verfahren festgestellt. Er führte u. a. mit 19 verschiedenen Böden eine einmalige vergleichende Keimzählung durch und kam dabei zu einer überraschend guten Übereinstimmung der Ergebnisse beider Verfahren. Die Höhe der Keimzahlen nach der Plattenmethode und dem Verdünnungsverfahren verhält sich nach Verf. wie 1 : 1,79.

Setzt man in der vorliegenden Arbeit die Werte der durch das Plattengußverfahren ermittelten Keimzahlen = 1 und errechnet die entsprechenden Verhältniszahlen der Ergebnisse beider Methoden, so ergibt sich eine außerordentliche Schwankung dieser Verhältniswerte.

Die Minima und Maxima der Vergleichswerte für jeden Boden sind nachstehend nebeneinandergestellt.

	Minimum	Maximum
Sandparzelle 1	1 : 0,6	1 : 7,6
„ 4	0,6	4,3
„ 7	0,9	5,5
Lehmparzelle 2	0,8	9,0
„ 5	2,0	7,7
„ 8	2,1	7,3
Moorparzelle 3	1,6	6,3
„ 6	1,3	8,3
„ 9	1,2	3,5

Hieraus ist die sehr starke Verschiebung der entsprechenden Zahlenverhältnisse in den Monaten Juni bis September zu erkennen. Besonders

bei den Keimzählungen der Lehmböden, weniger bei denen der Sandböden, war zu beobachten, daß die Verdünnungsmethode in diesen Monaten trotz der gleichen Bodenaufschwemmung bedeutend höhere Ergebnisse zeitigte.

Den Zahlenreihen ist zu entnehmen, daß bei einem Vergleich der Maximal- und Minimalverhältniswerte die Unterschiede bei den ungedüngten Parzellen bei weitem am größten sind im Gegensatz zu den gedüngten.

An Hand vorliegender Ergebnisse ist es nicht möglich, bei den stark schwankenden Verhältniswerten auch nur annähernd anzugeben, um wieviel Prozent durchschnittlich die nach beiden Methoden ermittelten Werte auseinanderliegen. Die Auffassung von Kühlmorgen-Hille und der von ihm angegebene Durchschnittsverhältniswert von 1 : 1,79 konnten nicht bestätigt werden.

d) Auswertung der Ergebnisse.

Die bei Anwendung der Verdünnungsmethode erzielten Befunde scheinen von bisher ungenügend geklärten biologischen Faktoren abhängig zu sein, so daß sie nur unter Vorbehalt als Grundlage für eine Beurteilung der verschiedenen Böden dienen können. Bei der Auswertung der Keimzählungsergebnisse kann daher erst in zweiter Linie auf sie Bezug genommen werden; es werden hier vielmehr die Ergebnisse des Plattengußverfahrens berücksichtigt, das dem tatsächlichen Entwicklungsverlauf der Keimgehalte näherzukommen scheint.

Im allgemeinen läßt sich der Entwicklungsverlauf der Keimgehalte in den 9 Böden folgendermaßen beurteilen:

Bis Mai konnte ein Ansteigen der Keimzahlen ermittelt werden, wobei die Lehmböden, absolut gemessen, den höchsten Keimzuwachs hatten. Die Sandböden und besonders die Moorerden blieben hinter ihnen zurück, die absolute Zunahme ihrer Keimgehalte war bedeutend geringer. Dies allein würde jedoch ein unvollständiges Bild der Entwicklung geben. Die prozentuale Zunahme der Keimgehalte bis Mai zeigt, daß gerade Parz. 3 mit der niedrigsten absoluten Keimvermehrung prozentual an der Spitze steht. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, daß innerhalb der drei Gruppen verschieden gearteter Boden jedesmal die ungedüngte Parzelle den größten relativen Zuwachs an Keimen hatte, obwohl diese ungedüngten Böden innerhalb ihrer Gruppen fast immer den niedrigsten absoluten Keimgehalt aufwiesen, ein Anhaltspunkt dafür, daß mikrobiologische Umsetzungen in extremen Boden oft schärfer hervortreten können als in weniger extremen. Bei dem später zu schildernden Verlauf der Stickstoffbindung und Salpeterbildung wird hierauf zurückzukommen sein. Abgesehen von Parz. 3 bewegte sich die prozentuale Zunahme der Keime innerhalb von 60,2 und 133,3%.

Die im Juni bei 8 Parzellen erfolgte starke Abnahme des Keimgehaltes der Böden kam, absolut gemessen, bei den Lehmböden am stärksten zum Ausdruck, etwas schwächer bei den Sandböden und Moorerden 6 und 9. Die Moorparz. 3 hat sich anders verhalten und soll daher am Schluß der Betrachtungen gesondert aufgeführt werden. Prozentual hatte die Moorerde von Parz. 9 die geringste Abnahme der Keime mit 52% des Mai-Maximums, die ungedüngte Parz. 1 (Sand), die größte mit 84,4%, während die übrigen Parzellen durchschnittlich Einbußen von 75% hatten. Vergleicht man die Keimzahlen von Juni und Januar, so fällt auf, daß die im Juni ermittelten Werte, besonders die der Sandböden, erheblich unter denen im Januar liegen. Innerhalb der 3 Lehmparzellen hat die ungedüngte Parz. 2 verhältnismäßig günstiger abgeschnitten als die beiden anderen. Der Grund dafür wird darin zu suchen sein, daß sich die günstigeren Eigenschaften der beiden anderen Parzellen infolge der extrem trockenen Verhältnisse im Juni nicht mehr auswirken konnten und die Angleichung an Parz. 2 erfolgte. Bezeichnend ist, daß nur im Juni die Keimzahlen der 3 Lehmböden so nahe beieinander gelegen haben, während die Werte der Sandböden nie große Abweichungen voneinander hatten. Bei der Moorerde von Parz. 6 und besonders von Parz. 9 ist der zahlenmäßige Unterschied der Januar- und Juni-Ergebnisse am geringsten.

Die im Juni und Juli ermittelten Keimzahlen unterscheiden sich kaum voneinander, nur bei den Parz. 7, 5 und 8 ist ein leichter Anstieg der Zahlen zu verzeichnen

gewesen. Die Böden erreichten dann im weiteren Verlauf der Entwicklung ein zweites Maximum, das sich bei den einzelnen Böden auf August und Oktober verteilte. Verglichen mit der Keimvermehrung im Frühjahr war die Zunahme der Keime von Juni ab gering. Bemerkenswert ist ein Vergleich der beiden Maxima. Die Mineralböden haben ihr Mai-Maximum nicht im entferntesten wieder erreicht, auch nach der im Juni erfolgten Keimverminderung nicht einmal wieder ihren Stand vom Januar zum Unterschied von den Moorerden der Parz. 6 und 9.

Die Keimzahlen der Moorparz. 3 bewegten sich bis Mai durchaus in demselben Rahmen wie die anderen, stiegen im Juni aber beträchtlich (um 67,7%). Der im Juli erfolgte Abfall war dann um so schärfer; er sank auf 15,4% des Juni-Keimwertes und blieb damit knapp unter dem Januar-Ergebnis. Im weiteren Verlaufe stiegen die Keimzahlen der Parz. 3 nochmals um 0,5 Millionen je Kubikzentimeter Erde. Von Juli bis November hatte die Moorparz. 3 wieder den geringsten Keimgehalt wie schon von Januar bis Mai.

Abschließend läßt sich bei der Beschreibung des Entwicklungsverlaufes der Keimgehalte von den 9 verschiedenen Böden sagen, daß sich dieser bis Juli einschließlich teilweise sehr verschieden und charakteristisch abgespielt hat, während die Unterschiede gegen Ende des Jahres weniger deutlich geworden sind.

Will man versuchen, die Ergebnisse und den Entwicklungsverlauf des Keimgehaltes zu erklären, so ist zunächst den Fragen nachzugehen, 1. welche Faktoren bestimmend oder beeinflussend gewirkt haben, 2. wie stark ihre Einwirkung gewesen ist und 3. inwieweit diese Faktoren sich gegenseitig verstärkten, aufhoben oder überdeckten.

Die erste Frage ist in früheren Arbeiten teilweise sehr verschieden beantwortet worden.

So mißt Remy (3) dem Einfluß der Bodentemperatur sehr große Bedeutung bei; O. Fabricius und O. v. Feilitzen (4) sind sogar der Ansicht, daß die Keimzahl parallel mit der Temperatur steige und falle. A. Stoeckli (5) legt auf Grund seiner Untersuchungen dem Einfluß von Temperatur und Feuchtigkeit großen Wert bei. Die Vermutung, daß der Wassergehalt des Bodens die Keimzahl maßgeblich beeinflußt, konnte von den meisten Autoren bestätigt werden. A. Rippel (6) führt hierzu eine Reihe von Zahlen an.

F. Khalil (7) kommt bei Versuchen mit ägyptischen Boden zu dem Ergebnis, daß außergewöhnliche Trockenheit die Keimzahl stark vermindert. Eine darauf folgende Feuchtigkeit hat in den ausgetrockneten Boden hohere Keimzahlen gebracht als in dauernd feuchtgehaltenen Böden, die der starken Austrocknung nicht ausgesetzt waren.

Zahlenangaben von Stocklasa (8) zeigen, daß die Wasserstoffionenkonzentration eines Bodens von großer Bedeutung ist. Er untersuchte den Keimgehalt der Böden im p_H-Bereich von 4—7,2 und erhielt steigende Werte von 6—78 Millionen pro Gramm Erde. Eine Ergänzung der Zahlenreihen von Stocklasa liefern die Angaben von K. Drews (9), der mit p_H-Werten von 2,4—4,7 arbeitete; bei p_H 2,4 fand er 14 000, bei p_H 4,7 nur 740 000 Keime.

Auch nach S. A. Waksman (10) verringert sich die Keimzahl im Boden, sowie dessen p_H-Wert unter 6,0 sinkt. Unterhalb von 4,8 wird nach seinen Beobachtungen der Keimgehalt sehr gering. Seine Angaben stimmen in dieser Hinsicht mit denen von Stocklasa und Drewes überein.

Die Frage eines jahreszeitlichen Einflusses auf die Keimzahl im Boden ist umstritten, obwohl sich in der letzten Zeit die Ansicht durchgesetzt hat, daß ein solcher Einfluß unabhängig von äußeren Faktoren tatsächlich besteht.

Löhnis (11, 12) stellte schon früher jahreszeitliche Schwankungen fest, die, wie er meint, durch andere Faktoren zwar beeinflußt, aber nicht bestimmt werden könnten. Das Ergebnis dieser grundlegenden Untersuchungen konnte er dann später an Hand weiterer eingehender Arbeiten bestätigen (13). Müntz und Gaudechon (14) behaupten, daß die Bakterien unbeeinflußt von anderen äußeren Faktoren eine jährliche Periode ihrer Entwicklung haben. Cutler, Crump und Sandon (15) haben ebenfalls eine Periodizität unabhängig von äußeren Einflüssen festgestellt und kommen zu Schlußfolgerungen, die sich mit denen von Löhnis decken.

A. Stoeckli (5) konnte bei seinen Ergebnissen zwei Höhepunkte im Frühjahr und Herbst feststellen, die sich mit seiner Ansicht nicht in Einklang bringen lassen, daß vorwiegend Temperatur und Feuchtigkeit die Keimzahl bestimmen. Thornton und Fisher (16) haben einen Rhythmus der Keimzahlen im Laufe eines Jahres beobachtet. Brown und Benton (17) stellten bei verschiedenen Boden Maxima der Keimgehalte im Juni und November fest, sind aber der Ansicht, daß dies nicht unbedingt auf jahreszeitlichen Einfluß zurückzuführen sei.

Es muß hier erwähnt werden, daß die eigentliche Ursache des jahreszeitlichen Rhythmus noch nicht erforscht ist. Da rein empirisch viele übereinstimmende Beobachtungen über Wechselbeziehungen zwischen jahreszeitlichem Rhythmus und mikrobiologischen Vorgängen und Umsetzungen vorliegen, unabhängig von anderen meßbaren Faktoren, wie z. B. Temperatur und Feuchtigkeit, erscheint es haltbar, den jahreszeitlichen Rhythmus als selbständigen Faktor mit wechselnder Wirkungsstärke anzusehen.

Ehe die vorliegenden Ergebnisse mit denen früherer Arbeiten verglichen werden können, ist es nötig, auf einen oft nicht genügend betonten Punkt hinzuweisen. Die Fragestellung, welcher Faktor oder welche Faktoren den Haupteinfluß auf die Keimzahl ausüben, ist nicht einwandfrei, da diese Faktoren keine Konstanten sind, sondern infolge ihrer absoluten Schwankungen ganz verschiedene Wirkungsstärken haben müssen, ganz abgesehen von der oft deutlichen gegenseitigen Beeinflussung der Faktoren untereinander. Nur dann, wenn keiner der Faktoren ins Minimum bzw. Maximum gerät, wird es möglich sein, annähernde Angaben über die Wirkungsstärke einzelner Faktoren zu machen. Aus diesem Grunde soll bei der Erklärung der Keimzahlergebnisse vorliegender Arbeit weniger Wert auf die Festsetzung einer Reihenfolge der einzelnen Faktoren nach ihrer Wirkungsstärke gelegt werden als auf eine Klärung ihrer gegenseitigen Beziehungen.

Betrachtet man den allgemeinen Entwicklungsverlauf des Keimwachstums in den Lehmböden, so fällt zunächst auf, daß alle 3 Böden mit einer einzigen, kaum merklichen Ausnahme im August höhere Keimzahlen aufwiesen als alle anderen. Dieser Abstand, der schon im Januar deutlich war, vergrößerte sich bis zum Mai stark, um sich dann rasch zu verringern. Obwohl die Unterschiede der Keimzahlen der einzelnen Böden von Juni ab kleiner sind, ist doch auch weiterhin eine Überlegenheit der Lehmböden vorhanden gewesen. Der Grund dafür liegt in dem höheren Nährstoffgehalt, der den Kleinlebewesen günstigere Lebens- und Entwicklungsmöglichkeiten gab. Bis zum Mai scheint dieser Faktor den Abstand der Lehmböden von den anderen vorwiegend bestimmt zu haben.

Die [H˙] kann auf diesen Verlauf kaum einen Einfluß ausgeübt haben, da sie auf annähernd gleicher Höhe stand wie bei den Sandböden und sich durchweg über dem von Waksman als kritisch bezeichneten Wert von p_H 6,0 hielt.

Die Temperatur hat allem Anschein nach die Ergebnisse nur in den drei ersten Monaten beeinflußt.

Merkwürdig erscheint zunächst das deutliche Steigen der Keimzahlen im Februar, obwohl die Temperatur gesunken war, und im Boden bei der Entnahme nur 1° C gemessen wurde. Der Probenahme am 16. 2. gingen starke Temperaturwechsel voraus, und es ist anzunehmen, daß diese fördernd gewirkt haben, zumal die Bodentemperaturen 9° C vorher nicht unterschritten hatten. Die offensichtliche Hemmung des Keimwachstums im März ist vorwiegend auf vorausgegangene Bodentemperaturen unter 0° zurückzuführen. Dieser Wachstumsstillstand zwischen Februar und März kann nicht durch die regenlose Zeit vom 19. 2. bis 12. 3. verursacht sein, da der am 14. 3. ermittelte Wassergehalt der Lehmböden von 18,8—18,9% durchaus befriedigend war. Größere Wasserverluste waren außer durch die bindende Kraft der Lehmböden durch die nie-

drigen Temperaturen verhindert worden. Die Märzergebnisse zeigen, daß der zunächst nur beeinflussende Faktor Bodentemperatur im März bestimmend auf die Vorgänge in den Böden eingewirkt hat, da er ins Minimum geriet. Im weiteren Verlauf des Versuchsjahres hat die Temperatur den Ablauf der Entwicklung kaum noch beeinflußt.

Im Juni trat ein auffälliger Rückgang aller Keimzahlen ein. Diese Erscheinung ist verursacht worden durch die 3 Wochen anhaltende Trockenzeit vom 4.—23. Juni, in der überhaupt keine Niederschläge gefallen waren. Der Wassergehalt der Lehmböden ist im Juni unter eine Mindestgrenze gesunken, die bei ihnen nahe bei 14% liegen muß. Diese 14% Wasser scheinen hygroskopisch an den Boden gebunden gewesen zu sein, so daß für das Bakterienwachstum kaum Wasser verfugbar war. Der gewissermaßen mit negativem Vorzeichen versehene Faktor Wasser ist dadurch zum bestimmenden Faktor geworden. Die Überlegenheit der Lehmböden gegenüber den anderen konnte daher nicht mehr zur Geltung kommen.

Es erhebt sich nun die Frage, inwieweit der jahreszeitliche Rhythmus an diesem Aufstieg und Abfall beteiligt war. Klar erkennbar ist sein Einfluß bei dem Anstieg der Keimzahlen aller Böden, besonders der Lehmböden, bis zum Mai. Vor allem läßt der ziemlich regelmäßige Abstand der Entwicklungslinien der einzelnen Böden darauf schließen. Die Ergebnisse zeigen ferner, daß der jahreszeitliche Rhythmus um so deutlicher erkennbar ist, je nährstoffreicher bzw. sorptionskräftiger der Boden ist. Eine Einwirkung des jahreszeitlichen Rhythmus im Juni ist nicht feststellbar; denn der scharfe Abfall ist dadurch bedingt, daß der Faktor Wasser ins Minimum geriet und somit bestimmend wurde. Im Juli war der Wassermangel völlig behoben, vielleicht war hier der Faktor Wasser sogar im Optimum. Eine Erhöhung der Keimzahl hätte erwartet werden können. Sie ist jedoch nicht eingetreten, weil der jahreszeitliche Rhythmus hier offenbar einen hemmenden Einfluß ausübte. Im weiteren Verlauf der Entwicklung scheint derselbe bei den Lehmböden keine ausschlaggebende Rolle mehr gespielt zu haben.

Der Anstieg der Zahlen von Parz. 8 ist aber wohl z. T. durch den Einfluß des jahreszeitlichen Rhythmus bewirkt worden, der sich aber nicht bestimmend hat durchsetzen können. Die steigende Tendenz des jahreszeitlichen Rhythmus hat sich im Herbst nicht mehr voll auswirken können, da sich die Strukturverhältnisse der brachliegenden Lehmböden infolge der starken Nässe im Juli wesentlich verschlechtert hatten. Dieser ungünstig wirkende Faktor hat ähnliche Wirkungen auf den Keimgehalt gezeitigt wie die Trockenheit im Juni, wenn auch natürlich längst nicht so stark. Immerhin liegen die ermittelten Werte sämtlicher Böden noch nahe beieinander. Die basisch gedüngte Lehmparz. 8 hatte infolge ihrer günstigeren Beschaffenheit am wenigsten unter dieser Bodenverschlechterung zu leiden und konnte sich am schnellsten erholen.

Ein kurzer Blick auf die entsprechenden Zahlen der Sandböden zeigt, daß diese unter den Folgen der Nässe nicht zu leiden hatten, Strukturverschlechterungen konnten auch nicht festgestellt werden. Die Werte liegen durchschnittlich höher.

Bei der Untersuchung der Frage, inwieweit die Düngung auf die Keimzahlen der Lehmböden eingewirkt hat, läßt sich feststellen, daß eine bestimmende Wirkung der verschiedenen Düngung nicht vorhanden gewesen ist. Von einem mittelbaren Einfluß der Düngung ist nur insofern zu sprechen, als die verschiedenen Düngergaben und der Pflanzenbestand die Strukturverschiedenheiten der ursprünglich gleichen Böden derselben Bodenart hervorgerufen haben. Innerhalb der Gruppe der Lehmböden waren sie jedoch geringfügig.

Die Keimgehalte der Sandböden und der basisch gedüngten Moorerde bewegen sich meist zwischen denen der Lehmböden und denen der beiden restlichen Moorerden, ausgenommen im Monat Juni.

Von Juli ab sind die Unterschiede entsprechend dem Gesamtverlaufe ziemlich ausgeglichen. Die Sandböden weisen im Unterschied zu den Lehmböden erst im April höhere Keimzahlen auf. Da von Januar bis März keine wesentlichen Veränderungen des Keimgehaltes der Sandböden eingetreten sind, hat der Faktor Temperatur hier vermutlich in den ersten 3 Monaten noch ausschlaggebender gewirkt als bei den Lehmböden. Von März bis Mai scheint der jahreszeitliche Rhythmus den Verlauf bestimmt zu haben, da der regelmäßige Anstieg bis Mai nicht unter dem Einfluß steigender Temperaturen vor sich gegangen ist.

Im Juni hatten die Sandböden ziemlich die gleiche prozentuale Keimabnahme wie die Lehmböden, sie bewegte sich zwischen 74,9—84,4% des Mai-Maximums. Auch hier ist dieses starke Sinken der Keimzahlen auf die große Trockenheit zurückzuführen.

Verwunderlich erscheint, daß die Keimzahlen der Sandboden durch die Nässe im Juli nicht günstig beeinflußt worden sind[1]). Die entsprechenden Zahlen des Juli bewegen sich ungefähr auf der gleichen Hohe mit denen des Juni. Es hat den Anschein, als ob diese Ergebnisse durch einen Tiefpunkt des jahreszeitlichen Rhythmus mitbestimmt worden sind.

Strukturverschlechterungen konnten bei den Sandböden im Gegensatz zu den Lehmböden nicht festgestellt werden. Die durchschnittliche prozentuale Zunahme der Keime bis zum Herbstmaximum liegt daher wesentlich höher als die entsprechende der Lehmböden.

Ein Einfluß der Düngung auf die Keimzahlen ist bei den Sandböden nicht erkennbar, auch nicht eine etwaige Nachwirkung infolge von dadurch bedingten Strukturverschiedenheiten wie bei den Lehmböden oder gar den Moorerden. Die etwas geringere Bindigkeit der ungedüngten Parzelle 1 hat sich im Vergleich zu den beiden anderen Parzellen nicht ungünstig ausgewirkt. Die Keimzahlen der 3 Sandböden liegen im allgemeinen so dicht beieinander, daß man kaum von Unterschieden sprechen kann, abgesehen vielleicht von den Ergebnissen der Monate Juli und August. Aber auch hier sind die Abstände zu gering, als daß man auf einen Einfluß oder eine Nachwirkung der Düngung schließen könnte.

Ein deutlicher Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Keimzahlen der Sandböden ist ebenfalls nicht erkennbar, da sich die Werte innerhalb der optimalen Grenzen bewegen und vor allem, wie die der Lehmböden, über p_H 6,0 liegen. Wäre ein Einfluß vorhanden gewesen, dann müßte Parzelle 1 einen geringeren Keimgehalt aufweisen als die beiden anderen, da sie um 0,46—0,60 niedrigere p_H-Werte hat.

Bei der vergleichenden Betrachtung der Keimzahlen der 3 Moorerden ist folgendes festzustellen. Im allgemeinen liegen die ermittelten Zahlen der Moorerden am tiefsten. Eine Ausnahme davon machen die Zahlen im Juni und das Verhalten von Parzelle 9 von dieser Zeit ab. Fragt man nach den Faktoren, die den Verlauf bestimmt oder beeinflußt haben, so läßt sich dies nicht einheitlich für alle 3 Moorerden beantworten. Das deckt sich mit der Tatsache, daß innerhalb der Gruppen der verschieden gearteten Böden die Moorerden die größten Unterschiede aufwiesen.

Die Keimzahl von Parz. 3 hat der Faktor Wasser bestimmt. Sie ist in dem Augenblick gestiegen, als die Wasserverhältnisse und damit auch die Bodenbeschaffenheit sich im Juni günstiger gestalteten. Die starke Empfindlichkeit von Parz. 3 gegen Wasserüberschuß geht dann aus dem scharfen Abfall im Juli hervor, als die Parz. 3 ihren niedrigsten Keimgehalt von 0,8 Mill. je g Erde hatte. Der schwache Anstieg bis zum Oktober ist wohl auf die etwas günstigeren Wasserverhältnisse zurückzuführen gewesen. Im großen und ganzen konnte der jahreszeitliche Rhythmus bei Parz. 3 nicht sonderlich zur Geltung kommen.

---

[1]) Ein Ansteigen der Zahlen wäre nach den Ergebnissen von F. Khalil (7) zu erwarten gewesen.

Auf die Keimzahlen von Parz. 6 hat im Gegensatz zu Parz. 3 die Wasserstoffionenkonzentration offenbar bis Mai deutlicher eingewirkt als das Wasser. Die Erde litt weniger unter zu reichlicher Feuchtigkeit, war dagegen etwas empfindlicher gegen Austrocknung, wie der starke Abfall der Keimzahlen im trockenen Juni und der schwache im nassen Juli belegt. Nur in diesen beiden Monaten hat das Wasser als Faktor alleinbestimmend gewirkt.

Die leichte Überlegenheit von Parz. 6 gegenüber Parz. 3 ist vorwiegend auf den geringeren Säuregehalt zurückzuführen. Die bessere Bodenbeschaffenheit hat zweifellos in der gleichen Richtung gewirkt. Die fast durchweg höheren Keimzahlen von Parz. 9 sind durch die bessere Bodenbeschaffenheit bestimmt worden. Diese hätte bessere Keimzahlen erwarten lassen, doch dürfte eine intensive Entwicklung von Bakterien auch hier durch die hohe Wasserstoffionenkonzentration verhindert worden sein. Im Juni ist der Faktor Wasser zunächst ins Minimum gekommen, im Juli hat er seine optimale Grenze nicht überschritten und hat so die Ergebnisse maßgebend beeinflußt.

Vergleicht man die Keimzahlen der 3 Moorerden miteinander, dann läßt sich ein deutlicher mittelbarer Einfluß der Düngung feststellen, die die ursprünglich übereinstimmenden Böden strukturell sehr verändert hat. So ist auch die Differenz zwischen Parzelle 9 und den beiden anderen zu erklären. Ein Einfluß der Reaktion liegt hier nicht vor; denn dann wären bei Parzelle 6, die eine höhere p_H-Zahl aufweist, auch höhere Ergebnisse zu erwarten gewesen.

e) Beziehungen zwischen Keimzahl und Ertrag.

In der Frage der Beziehungen zwischen Keimzahl und Ertrag konnten die Auffassungen von Christensen (18) und S. A. Waksman (19) bestätigt werden, daß zwar gewisse Übereinstimmungen vorhanden sind, daß aber die Keimzahl kein Maßstab für die Fruchtbarkeit eines Bodens zu sein braucht. Eine Gegenüberstellung der Durchschnittswerte von Keimzahl und Erträgen, bezogen auf Parzelle 8 = 100, zeigen dies deutlich (Tab. 6).

Tab. 6. Beziehungen zwischen Keimzahlen und Erträgen.

Boden	Durchschnitt der Ertragsverhältniszahlen 1928/29 (Parz. 8 = 100)	Jahresdurchschnitt der Keimzahlen von 1930 (Parz. 8 = 100)
Sandparzelle 1	26,0	31,2
,, 4	23,2	36,3
,, 7	52,3	39,7
Lehmparzelle 2	66,6	80,3
,, 5	73,1	73,9
,, 8	100,0	100,0
Moorparzelle 3	22,6	7,7
,, 6	37,3	9,8
,, 9	92,4	27,3

Demnach scheint die Übereinstimmung dann verhältnismäßig gut zu sein, wenn Böden höherer Qualität untersucht werden.

2. Stickstoffbindung.

a) Methodik.

Die monatlich von den 9 Parzellen entnommenen Bodenproben wurden zunächst an der Luft getrocknet. Dann wurden je 5 g der einzelnen Böden in je 5 sterile, 300 ccm fassende Erlenmeyerkolben gebracht und mit je 50 ccm einer Nährflüssigkeit folgender Zusammensetzung überschichtet:

Bodenauszug	100,00 ccm
Dikaliumphosphat	0,1 g
Mannit	1,0 g

Bei diesen Untersuchungen wurde derselbe Bodenauszug wie bei den Keimzählungen verwendet. Auch hier zeigten Vorversuche, daß eine schnellere und kraftigere Entwicklung der Organismen festgestellt werden konnte, wenn der auf S. 7 erwähnte Bodenauszug Verwendung fand. Dabei wurde gleichzeitig erreicht, daß die Unterschiede zwischen den einzelnen Boden besser zum Ausdruck kamen. Nach Überschichtung mit der Nährflüssigkeit wurde in jeden Kolben eine Messerspitze Kalziumkarbonat gegeben. Nach kräftigem Durchschütteln wurden dann je 4 Kolben bei 22⁰ bebrutet, während je ein Kolben zur sofortigen Stickstoffbestimmung diente. Nach 10 Tagen erfolgte die Bestimmung des Gesamtstickstoffs in den einzelnen Kolben nach Kjeldahl. Nach Abzug des ursprünglichen Stickstoffgehaltes des Kolbeninhaltes ergab sich die assimilierte Stickstoffmenge je 5 g Erde.

b) Ergebnisse.

Die graphischen Darstellungen Abb. 5—7 lassen die Veränderungen der Stickstoffbindungsintensität in den einzelnen Monaten deutlich zum Ausdruck kommen.

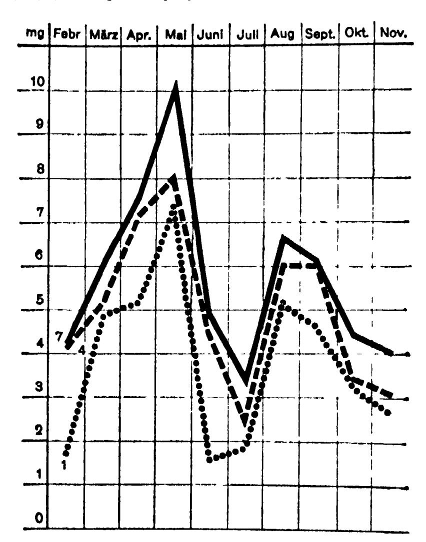


Abb. 5. Stickstoffbindung in mg je 5 g Erde (Sandböden).

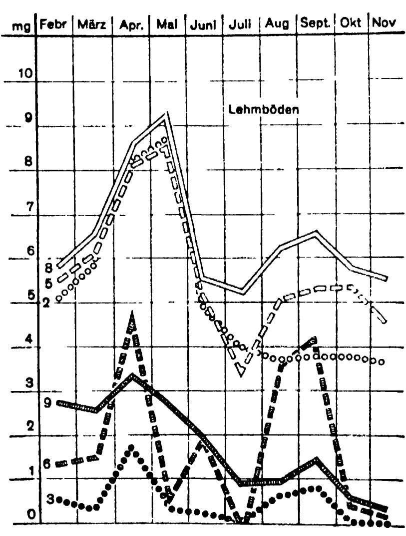


Abb. 6 u. 7. Stickstoffbindung in mg je 5 g Erde (Lehmboden und Moorerden).

c) Auswertung der Ergebnisse.

Die 6 Mineralböden wiesen trotz erheblicher Unterschiede untereinander den gleichen Entwicklungsverlauf auf im Gegensatz zu den Moorerden, die daher gesondert betrachtet werden sollen. Bei den Mineralböden stiegen die Mengen an gebundenem Stickstoff bis Mai an, fielen dann bis zum Juli ab und stiegen danach im Herbst zu einem zweiten, etwas geringeren Höchstgehalt, um sich dann erneut abwärts zu bewegen.

Bei den Lehmböden war der Anstieg bis zum Mai-Maximum ziemlich regelmäßig. Absolut und prozentual war er bedeutend geringer als bei den Sandböden. Hier war der Abfall im Sommer sehr scharf, besonders bei Parzelle 1, bei den Lehmböden schwächer, vor allem bei Parzelle 8. Beim Anstieg zum 2. Maximum entstand dasselbe Bild, starke und absolute prozentuale Zunahme bei den Sandböden, demgegenüber eine ziemlich ge-

ringe Zunahme bei den Lehmböden 8 und 5. Bei Parzelle 2 konnte sogar eine geringe Abnahme gegenüber dem Juli-Ergebnis festgestellt werden. Die Unterschiede zwischen den Lehm- und Sandböden sind beim Herbstmaximum etwas zugunsten der Sandböden verschoben, jedenfalls waren die Lehmböden nicht eindeutig überlegen. Die Höchstwerte im Herbst fielen bei den Mineralböden zeitlich nicht zusammen. Die Sandböden erreichten ihr 2. Maximum im August, die Lehmböden erst im September. Bei ihnen dürfte der Tag der Untersuchung ungefähr den Wendepunkt getroffen haben, während aus dem Kurvenverlauf der Sandböden zu schließen ist, daß der Wendepunkt erst Ende August erreicht wurde. Dafür spricht der geringe Abfall von August bis September und der anschließende stärkere von September bis Oktober. Noch mehr deutet aber die gleiche Höhe der Ergebnisse von August und September bei Parzelle 4 darauf hin. Es ist kaum anzunehmen, daß sich die Stickstoffbindung 4 Wochen lang überhaupt nicht verändert hat. Nach Erreichen des Herbstmaximums ist im allgemeinen wieder der ziemlich unvermittelte und scharfe Abfall bei den Sandböden bezeichnend im Gegensatz zu dem sanften Abgleiten der bei den Lehmböden ermittelten Werte. Wie schon angedeutet wurde, lagen die Werte der Sandböden trotz des zweimaligen, verhältnismäßig scharfen Auf- und Abstieges absolut gemessen unter denen der Lehmböden. Nur im Mai und August konnte Parzelle 7 die Lehmparzelle 8 überholen. Sonst lag diese stets an der Spitze, ihr folgten meist die beiden anderen Lehmböden, die erst nach August größere Unterschiede aufwiesen. Der Entwicklungsverlauf der Stickstoffbindung bei den Sandböden ist insofern bemerkenswert, als die Böden stets die Reihenfolge 7, 4, 1 einhielten.

Bei den Moorerden hat sich die Stickstoffbindung ganz anders gestaltet. Alle 3 Erden erreichten im April ein Maximum und fielen dann bis Juli ab, wobei Parzelle 6 im Juni eine nochmalige Steigerung um 1,33 mg N erfuhr, die aber keine allgemeine Tendenz angibt, sondern in den Eigenarten der betreffenden Versuchsgefäße begründet sein dürfte. Im allgemeinen hielt sich die Stärke der Stickstoffbindung bei den Moorerden in wesentlich niedrigeren Grenzen als bei den Vergleichsböden.

Wie schon angedeutet, wurde davon abgesehen, die Versuche mit Azotobakterreinkulturen durchzuführen, um nicht die stickstoffbindende Kraft der Bakterien durch mehrfaches Überimpfen zu schwächen und um unter Nachahmung von natürlichen Verhältnissen evtl. Wechselbeziehungen der in der Rohkultur befindlichen Kleinlebewesen, im besonderen der Azotobakterzellen, zur Wirkung gelangen zu lassen.

Die Untersuchungen zeigten, daß die Mineralböden Azotobakter enthielten. Bei den Lehmböden, besonders bei Parz. 8, gelang die Anreicherung am raschesten, die typische Kahmhaut konnte bereits nach einigen Tagen beobachtet werden. Sie war stets tiefdunkelbraun, meist nicht allzu dick und begann am 9.—10. Tage zu zerfallen. Im Juni und Juli, weniger deutlich im Oktober und November, verzögerte sich die Häutchenbildung um etwa 2—3 Tage. Die Häutchen waren in den genannten 3 Monaten auch sehr dünn und etwas heller. Parz. 2 hatte am Ende des Jahres ein geringeres Azotobakterwachstum als die beiden anderen Lehmparzellen; es wurde offenbar durch die hier stärker auftretende Buttersäuregärung gehemmt. Sonst konnten Wachstumsverschiedenheiten innerhalb der Gruppe der Lehmböden nicht festgestellt werden.

Bei den 3 Sandböden konnten unmittelbare Wachstumsunterschiede der 3 Azotobakterstämme in den einzelnen Kolben nicht beobachtet werden. Sie unterschieden sich nur durch die Schnelligkeit ihrer Entwicklung. Parz. 1 schien eine langsamer wachsende Rasse zu enthalten. Die Häutchenbildung setzte bei den Sandböden später ein als bei den Lehmböden, auch im Mai und August bei Parz. 7, obwohl in diesen

beiden Monaten die höchsten Stickstoffgewinne festgestellt wurden. Die hier aufgetretenen Azotobakterhäutchen waren meist grauweiß, selten bildete sich ein dunkles Pigment. Bei den Sandböden waren die Häutchen meist dick und gegen Ende des Versuchs stark runzlig, fast immer unversehrt, nie zerfallen. Wie bei den Lehmboden konnten auch im Juni und Juli, dann auch im Oktober und November, Wachstumshemmungen beobachtet werden, besonders auffallend bei Parz. 1. Die Azotobakterrassen der Sandböden unterschieden sich von denen der Lehmboden noch wesentlich in der Zellgröße. Die Organismen der Sandböden blieben im Durchschnitt kleiner, die der Lehmböden wuchsen meist zu großen Zellen heran; dies konnte besonders bei Parz. 8 beobachtet werden. Im Juni und Juli unterblieb auch bei den Lehmböden die Bildung größerer Zellen.

Bei den Moorerden war das Azotobakterwachstum sehr verschieden. Bei der Untersuchung der Proben von Parz. 3 konnte der Ansatz zur Bildung eines Azotobakterhäutchens nur im April beobachtet werden, in den übrigen Monaten war stets eine schwache Buttersäuregärung vorhanden, die im August und September stärker auftrat. Nach Überimpfung der Anreicherungskulturen in schwach alkalische Nahrflüssigkeit bildete sich weder ein Häutchen, noch wurde Stickstoff aus der Luft gebunden. Trotzdem wurden runde, dem Azotobakter ähnliche Zellen in den Kulturen beobachtet. Da im April Azotobakter tatsächlich vorhanden war, scheint es sich auch in den anderen Monaten um diesen Mikroorganismus gehandelt zu haben. Bei den Kolben von Parz. 9 kam es im April, Mai und September zu einer schwachen Häutchenbildung, in den übrigen Monaten konnte nur Buttersäuregärung festgestellt werden. Bei Parz. 6 setzte im April, Juni, August und September ein normales Azotobakterwachstum ein. In den ubrigen Monaten waren mit gewisser Einschränkung des Februar kaum Ansätze zur Bildung eines Azotobakterhäutchens vorhanden; vielmehr war an Stelle der Azotobakterentwicklung eine starke Buttersäuregärung getreten.

Zum Schluß sei noch bemerkt, daß bei den Mineralböden, meist am 8. oder 9. Versuchstage, eine Begleitflora von kleinen, schlanken Kurzstäbchen auftrat, die in enger Berührung mit den Azotobakterzellen waren, sich nur selten vereinzelt aufhielten, sondern meist zu kleinen Verbänden von Stäbchen zusammengeballt waren.

Die Frage nach den Faktoren, die die freie Stickstoffbindung beeinflussen und bestimmen, ist verschieden beantwortet worden.

Nach S. A. Waksman (19) müssen vorhanden sein[1]):

1. geeignete Energiequelle,
2. Kalk,
3. Phosphorsäure,
4. günstige Temperatur,
5. genügende Luftzufuhr.

H. Wenzel (29) hat bei seinen Untersuchungen festgestellt, daß Azotobakter in Sandböden langsamer eindringt als in lehmige und humushaltige. Ein Einfluß der Bodenart geht daraus deutlich hervor. F. Löhnis (21) betont, daß die Zahl der zur Stickstoffbindung befähigten Kleinlebewesen „sehr bedeutend" ist und „daß es vor allem von den physikalischen und chemischen Eigenschaften des betreffenden Bodens abhängt, ob es zu einer ausgiebigen Stickstoffbindung kommt oder nicht". Im weiteren hebt Löhnis hervor, daß „die Menge und die Beschaffenheit des vorhandenen Humus eine ausschlaggebende Rolle spielt". Er bezeichnet eine Bindung von 1 Teil Stickstoff auf 100 Teile kohlenstoffhaltige Substanz als ziemlich gut. In bezug auf die Beurteilung der Laboratoriumsversuche kommt Löhnis zu dem Ergebnis, daß „bei einwandfreier Versuchsanordnung die Anhäufungs- und die Erdversuche analoge Resultate geben". Die Stickstoffbindung ist nach F. Löhnis und N. U. Pillai (22) von Wassergehalt, Feuchtigkeit und Temperatur ziemlich unabhängig. Nach Trockenperioden konnte jedoch ein schärferer Abfall festgestellt werden als nach Nässeperioden. F. Khalil (7) hat auch die Beobachtung gemacht, daß starke Trockenheit die Stickstoffbindung vermindert. Bei seinen Untersuchungen mit ägyptischen Böden scheint der sehr starke Wassermangel ein die Stickstoffbindung bestimmender Faktor gewesen zu sein. Die Temperatur übt nach F. Löhnis und Westermann (23) keinen großen Einfluß aus, solange sie das nahe beim Nullpunkt gelegene Minimum nicht unterschreitet. Als Optimum wird die Temperaturspanne von 25—30° C angegeben. E. Haselhoff und O. Liehr (24) haben sich mit dem Einfluß der Düngung

[1]) Die Bedingungen sind nach Waksman in der Reihenfolge ihrer Bedeutung genannt.

auf die freie Stickstoffbindung beschäftigt und kommen zu der Ansicht, daß zwischen Stickstoffgewinn und Höhe der Düngung keine bestimmten Beziehungen bestehen.

Über die Wirkung der Wasserstoffionenkonzentration auf Azotobakter liegt eine große Reihe von Untersuchungen vor. U. a. P. L. Gainey (25—29), Christensen (40) und Lundegårdh (30), H. Niklas und Hirschberger (31), H. Niklas, H. Poschenrieder und A. Hock (32), H. Niklas und H. Poschenrieder (33). Daraus ist ersichtlich, daß die untere Wachstumsgrenze bei einem p_H von etwa 5,8—6,0 liegt.

Wichtig ist auch hier wieder die Beantwortung der Frage, ob und inwieweit der jahreszeitliche Rhythmus als bestimmender oder beeinflussender Faktor auf die Ergebnisse und den Entwicklungsverlauf einwirkt.

F. Lohnis (34, 35) hat schon 1905 bei seinen Untersuchungen Schwankungen bemerkt, die er auf Einwirkung der Periodizität zurückführte. Durch spätere Untersuchungen mit Pillai (22) konnte er seine Auffassung unterstreichen. Deutliche periodische Schwankungen im Auftreten von Azotobakter wurden beobachtet. Bei Versuchen von Kießling (36) traten Schwankungen im Azotobakterwachstum auf, die im Frühjahr und Herbst zu einem Maximum, im Sommer und Winter zu einem Minimum fuhrten. C. Bihler (37) hebt hervor, daß die Azotobakterhäutchen im Frühjahre schneller auftraten und daß ein Einfluß der „Jahreszeit" auf die Stärke der Azotobakterentwicklung deutlich sei. Die Arbeit von Bihler ist in anderer Beziehung noch bemerkenswert. So konnte er bei der Prüfung verschiedener nach einem Dauerdüngungsplan gedüngten Böden die größte Stickstoffbindung bei der ungedüngten Parzelle feststellen. Die Entwicklung der Kahmhaut ist nach seiner Meinung kein Maßstab für die N-Bindungskraft des Bodens, ebensowenig wie ihre Schwarzfärbung. Bei Kalkzugaben zu den Versuchskolben trat eine bessere Entwicklung ein. Bihler nahm die Stickstoffbestimmung erst nach 3 Wochen Versuchsdauer vor und fand im allgemeinen sehr ausgeglichene Werte. Er schließt daraus, daß zwischen Düngung und Stärke der Azotobakterentwicklung keine unmittelbaren Beziehungen bestehen. Hierauf wird zurückzukommen sein[1]).

Betrachtet man den Verlauf der Stickstoffassimilation bei den Mineralböden, so läßt sich in voller Übereinstimmung mit Löhnis (34, 35, 22) eine bestimmende Einwirkung des jahreszeitlichen Rhythmus feststellen.

Es ist anzunehmen, daß der deutliche Rückgang bei den Mineralböden im Juni zum großen Teil durch die Trockenheit bedingt war, dagegen ist das starke Absinken der Ergebnisse von Parz. 1 und das Verhalten der Böden im Juli nicht auf klimatische Faktoren zurückzuführen. Wenn auch bei den Lehmböden vielleicht der Einwand geltend gemacht werden kann, daß die zu großen Feuchtigkeitsmengen fur Azotobakter schädlich waren, ist er bei den Sandboden unter keinen Umständen aufrechtzuerhalten, besonders bei Parz. 4 und 7. Hier hätte sogar ein erneutes Ansteigen erwartet werden können, da der Wassergehalt fur Azotobakter als günstig anzusprechen war. Auch die intensive Stickstoffbindung im Herbst und der deutliche Abfall im Oktober sind nicht auf den Faktor Wassergehalt zuruckzuführen, sondern durch den jahreszeitlichen Rhythmus bedingt. Es hat sich also gezeigt, daß der Faktor Wasser eine deutliche Einwirkung auf die Stickstoffbindung nur ausubte, wenn er ins Minimum kam.

Zunächst sei noch kurz geprüft, inwieweit unter Umständen andere Faktoren die Ergebnisse bei den Mineralböden beeinflußt haben. Die Wasserstoffionenkonzentration hat bei ihnen keinen Einfluß ausgeübt, da mit Ausnahme von Parzelle 2 alle p_H-Werte · innerhalb der von Gainey angegebenen Optimalspanne von 7,0—7,8 lagen. Das Verhalten von Parzelle 2 beweist gerade, daß die Reaktion keinen Einfluß ausgeübt hat; wäre es

---

[1]) Die bei Bihler aufgetretenen Unterschiede in den Parallelen erklärt H. Butenschön (38) damit, daß der ganze den Versuchen dienende Boden des Dauerdüngungsversuches im Jahre 1924 aus dem Freiland in Betonkästen umgelegt worden ist. Im übrigen kommt Butenschön in der Fortsetzung der Arbeiten von Bihler zu ähnlichen Ergebnissen.

anders, so müßten die gebundenen Stickstoffmengen von Parzelle 2 mit p_H 6,49 tiefer liegen als die der anderen Mineralböden, was nicht der Fall ist. Ein Einfluß der Temperatur ist nicht beobachtet worden und war nach Löhnis (32) in den hier eingehaltenen Grenzen auch nicht zu erwarten.

Die ermittelten Zahlenwerte an gebundenem Stickstoff sind weniger das Ergebnis von äußeren Faktoren, die das Azotobakterwachstum bestimmt und beeinflußt haben, als vielmehr das Ergebnis der Leistung bestimmter Azotobakterrassen, die sich unter dem Einfluß der entsprechenden Umweltbedingungen herausgebildet haben. Diese Leistungen der verschiedenen Azotobakterrassen sind zunächst gebunden an die Umwelt, in der diese Rassen sich entwickelt und gelebt haben und die sie gewissermaßen zu dieser bestimmten Leistung gebracht hat. Sie lassen sich nicht beliebig einfach dadurch ändern, daß man den Azotobakterrassen andere Existenzbedingungen bietet. Würde das möglich sein, dann könnten so deutliche Unterschiede im Laboratoriumsversuch bei Anwendung der gleichen Mannitnährlösung nicht entstehen. Der Anhäufungsversuch zeigt erst an, zu welchen Höchstleistungen die verschiedenen Azotobakterrassen befähigt sind. Um das auch für die vorliegenden Fälle experimentell zu beweisen, wurden entsprechende Versuche angesetzt. Von Parzelle 7 und 8, 1 und 6 wurden Mitte Juni Azotobakterrohkulturen angelegt. Sofort nach der Häutchenbildung wurde je eine Öse in frische Versuchskolben der Parzellen 1 und 6, 8 und 7 übergeimpft. Diese Kolben waren in der üblichen Weise vorgerichtet worden und wurden nach 10 Tagen auf ihren Stickstoffgewinn untersucht. Sie hatten also neben ihrer bodenständigen Azotobakterrasse eine fremde durch Überimpfung erhalten. Die Ergebnisse sind in Tab. 7 zusammengestellt.

Tabelle 7. Stickstoffbindung in Milligramm N je 5 g Erde.

Azotobakterrohkultur von Parzelle Nr.	Übergeimpft in Versuchskolben v. Parzelle Nr.	Stickstoffbindung der Parallelen	im Durchschnitt	der Parzellen 8	7	1	6
6	7	4,62 5,04 4,62	4,76	—	4,97	—	2,03
6	8	5,46 5,60 5,60	5,55	5,60	—	—	2,03
1	7	5,04 5,04 4,90	4,99	—	4,97	1,63	—
1	8	5,88 5,46 5,46	5,60	5,60	—	1,63	—
7	6	1,40 2,10 2,80	2,10	—	4,97	—	2,03
7	1	1,68 1,40 1,68	1,59	—	4,97	1,63	—
8	6	2,24 1,96 1,68	1,96	5,60	—	—	2,03
8	1	1,82 1,40 1,82	1,68	5,60	—	1,63	—

Die Zahlen zeigen, daß die Stickstoffbindung weder durch eine fremde leistungsfähigere Azotobakterrasse erhöht noch durch eine fremde leistungsschwächere erniedrigt werden konnte. Ein Beleg dafür, daß sich in diesen Fällen die bodenständige Azotobakterrasse durchgesetzt hat. Versuche mit gemischten Erden haben zu keinem eindeutigen Ergebnis geführt. Die Werte zeigten innerhalb der Parallelen starke Abweichungen.

Setzt man das Vorhandensein verschieden leistungsfähiger Azotobakterrassen voraus, so läßt sich das Verhalten von Parz. 1, besonders der scharfe Abfall ihrer Werte im Juni, ohne Schwierigkeiten erklären. Die schwache Stickstoffbindung war bedingt durch eine leistungsschwache Azotobakterrasse, die sich auf Grund der besonders schlechten Struktur- und Nährstoffverhältnisse gebildet hatte. Das Nachlassen der Stickstoffbindung von Parz. 7 und 4 im Juli und die konstante Intensität bei Parz. 1 würde durch eine augenblickliche, durch die große Trockenheit hervorgerufene Schädigung der Leistungsfähigkeit der 3 Azotobakterrassen bedingt sein, die erst durch das neue Ansteigen der jahreszeitlichen Wirkungskräfte behoben worden ist. Es entspricht ganz dem Charakter der 3 extremen Sandböden, wenn die sie bewohnenden Azotobakterrassen auch extreme Eigenschaften aufwiesen. Der Verlauf der Stickstoffbindung in den Sandparzellen kann dies bestätigen, der Auf- und Abstieg der Werte war sehr scharf, am schärfsten bei Parz. 1 mit den ungünstigsten Bedingungen. Vergleicht man diesen wechselnden Entwicklungsverlauf bei den Sandböden mit dem der Lehmböden, so fällt dessen Ausgeglichenheit auf, besonders bei Parz. 8.

Die durchschnittlich geringen Stickstoffgewinne der Moorerden sind vorwiegend durch die niedrigen p_H-Werte bestimmt worden. Bei Parz. 3 konnte nur einmal, im April, ein geringer Ansatz einer Azotobakterentwicklung beobachtet werden, dadurch wurde die Stickstoffbindung von 0,28 auf 1,75 mg N erhöht. Bei Parz. 9 kam Azotobakter dreimal zur Entwicklung, wodurch in jedem Falle eine höhere Bindungsleistung bedingt wurde. Das Azotobakterwachstum im Mai war schwach, die gefundenen Werte dementsprechend kleiner. Bei Parz. 6 konnte Azotobakter viermal festgestellt werden, wobei in den Parallelversuchskolben übereinstimmend dünne schwarze Häutchen auftraten. Die Ergebnisse von Parz. 6 zeigten, daß eine nennenswerte Stickstoffbindung nur dann eintrat, wenn auch Azotobakter nachgewiesen wurde. Es kann daher in Übereinstimmung mit früheren Befunden geschlossen werden, daß Azotobakter wesentlich größere Stickstoffmengen zu binden vermag als die übrigen freilebenden stickstoffbindenden Mikroorganismen. Es verdient hervorgehoben zu werden, daß Azotobakter bei den in Rede stehenden Moorerden insgesamt in 8 Fällen zur Entwicklung kam, davon lagen 7 innerhalb des Frühjahrs- bzw. des Herbstmaximums. Auch hier muß ein Einfluß des jahreszeitlichen Rhythmus erblickt werden, wenn auch in weniger überzeugendem Maße als bei den Mineralböden. Bei den Moorerden hat also ein Zusammenwirken des jahreszeitlichen Rhythmus und der Reaktion die Höhe der Stickstoffbindung bestimmt.

Gegen die im Juni und Juli beobachteten Wachstumshemmungen des Azotobakter bzw. die Abnahme der Stickstoffgewinne kann eingewendet werden, daß hier Störungen rein methodischer Art vorlagen und daß die Anreicherungskulturen zwar langsamer wuchsen, aber bei entsprechender Verlängerung des Versuches schließlich die gleiche Stickstoffbindung aufgewiesen hätten wie in den Monaten des intensiven Wachstums. Um über diese Vorgänge ein klares Bild zu bekommen und um zu prüfen, inwieweit sich die einzelnen Böden in dieser Hinsicht voneinander unterscheiden, wurde im August der Verlauf der täglichen Stickstoffbindung untersucht. Von den am 1. Versuchstag angesetzten Versuchskolben wurden vom 2.—15. Tage je 3 Kolben abgenommen und auf ihren Stickstoffgewinn untersucht. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Parallelkolben waren im allgemeinen ziemlich ausgeglichen, besonders, je mehr sich der Versuch dem 15. Tage näherte.

Die graphische Darstellung Abb. 8 läßt den Entwicklungsverlauf in den Anreicherungsversuchen der einzelnen Böden im August deutlich werden.

Betrachtet man die Ergebnisse der täglichen Stickstoffbindung an Hand der Kurven, so läßt sich folgendes sagen: Die Stickstoffbindung setzte bei den 9 Böden zu verschiedenen Zeiten ein. Der Beginn lag bei den Mineralböden zwischen dem 2. und 4. Tage, während die Moorerden erheblich später erst Stickstoffgewinne zeigten. Bei allen Böden setzte die Stickstoffbindung zunächst langsam ein, um dann zu einem bestimmten Zeitpunkt sehr intensiv anzusteigen. Diese verstärkte Stickstoffbindung dauerte durchschnittlich 2 Tage. Sowohl im Zeitpunkt des Beginnes dieser Intensitätsperiode als auch in der während dieser Zeit gebundenen Stickstoffmenge konnten teilweise beträchtliche Unterschiede zwischen den 9 Böden festgestellt werden, wie folgende Zusammenstellung zeigt. (Tab. 8.)

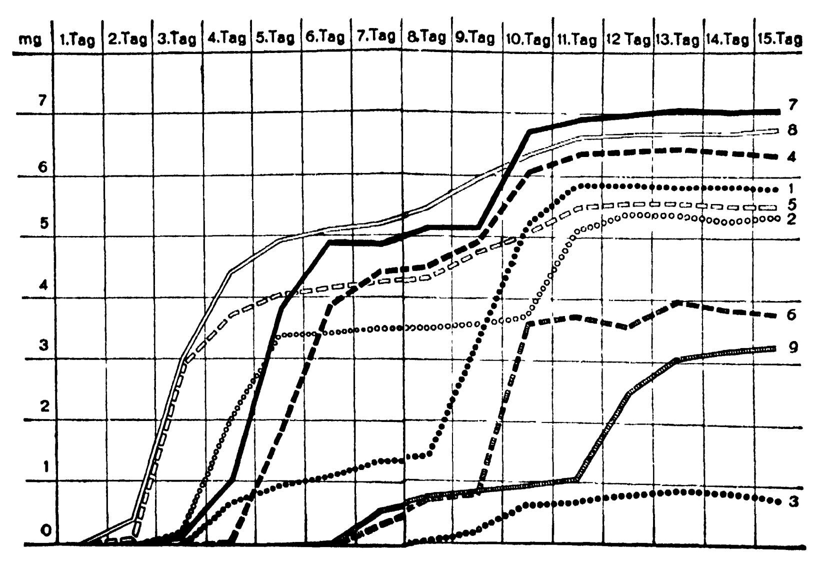


Abb. 8. Verlauf der Stickstoffbindung vom 1.—15. Tag des Anreicherungsversuches in Milligramm je 5 g Erde.

Tabelle 8.
Stickstoffbindung in Milligramm N je 5 g Erde während der Intensitätsperiode.

Parz. Nr.	Beg. der N-Ass. (Tag)	Beg. der Int.-Per. (Tag)	Ende d. Int.-Per. (Tag)	mg N assimiliert während d. Int.-Per. 1. Tag	2. Tag	Ges.-Mg	bis zum 15. Tag	Assim. N in d. Int.-Per. i. % d. G.-N
8	2.	3.	4.	2,51	1,57	4,08	6,72	60,7
5	2.	3.	4.	2,80	0,84	3,64	5,60	65,5
2	3.	4.	5.	1,88	1,34	3,22	5,37	60,0
7	3.	4.	6.	0,89	3,92[1])	4,81	7,09	67,8
4	4.	5.	6.	1,72	2,15	3,87	6,49	59,6
1	4.	9.	10.	1,82	1,96	3,78	5,88	64,3
9	7.	12.	13.	1,40	0,56	1,96	3,22	60,9
6	7.	10.	10.	2,80	—	2,80	4,01	69,8
3	8.	9.	10.	0,18	0,40	0,58	0,89	65,2

[1]) Bei Parz. 7 ist auch noch der darauffolgende Tag berücksichtigt worden mit einer Zunahme von 1,08 mg assim. N.

Bei den Lehmböden setzte die Stickstoffbindung am raschesten ein und erreichte in kürzerer Zeit ihr Maximum als bei den Sand- und Moor-

böden, und unter den Mineralböden waren es die basisch gedüngten, die das stärkste Stickstoffbindungsvermögen besaßen. Während der kurzen Periode intensiver Stickstoffbindung wurden rund 60—70% des gesamten Stickstoffgewinnes beobachtet. Hierin scheint eine gewisse Gesetzmäßigkeit zum Ausdruck zu kommen, da diese Beobachtung trotz der großen Bodenverschiedenheiten und trotz des sehr verschiedenartigen Verlaufes der täglichen Stickstoffbindung bei allen Böden gemacht werden konnte.

Vergleicht man die Ergebnisse des 10. Tages von Parz. 1 und 5, so ergibt sich eine fast absolute Übereinstimmung der Werte, obwohl der Entwicklungsverlauf, der zu diesen Werten geführt hat, sehr verschieden gewesen ist. Parz. 1 zeichnete sich durch lange Anlaufzeit und späte Intensität aus, daran schloß sich bei ihr eine sehr geringe Zunahme der Gesamtstickstoffbindung an.

Nach Ablauf der Intensitätsperiode verlief die weitere Stickstoffbindung ziemlich langsam und gleichmäßig. Zwischen dem 9. und 11. Tage war eine nochmalige mehr oder weniger deutliche Leistungssteigerung zu beobachten, bei Parz. 9 etwas später. Die Stickstoffbindung bei den Mineralböden war im wesentlichen am Ende des 11. oder 12. Tages abgeschlossen, bei den Moorerden verschob sich dieser Zeitpunkt. Die Unterschiede der Mineralböden waren am 15. Tage ziemlich ausgeglichen, die größte Differenz betrug nur 1,77 mg N. Die Moorerden sind naturgemäß wegen ihres hohen Säuregehaltes abgefallen, auch schwankten die einzelnen Parzellen hier je nach Assimilantenflora oft recht erheblich und setzten dadurch die Zuverlässigkeit der Ergebnisse herab, wofür auch die folgende Zusammenstellung spricht.

Tabelle 9. Einfluß der Buttersäuregärung auf das Azotobakterwachstum.

Parzelle Nr.	Tag der Abnahme	Azotobakter-wachstum	Buttersaure-gärung	Einzelwerte d. Parallelen in mg	mg assim. N (Durchschnitt)
		A	(b)	4,48	
6	11.	A	(b)	4,76	3,73
		a	B	1,96	
		A	(b)	4,48	
6	12.	A	(b)	4,48	3,59
		—	B	1,82	
		A	b	3,22	
9	12.	a	B	2,52	2,52
		—	B	1,82	
		A	b	3,64	
9	13.	A	b	3,50	3,08
		a	B	2,10	

Zeichenerklärung: A = starkes Azotobakterwachstum; a = schwaches Azotobakterwachstum; B = starke Buttersäuregärung; b = schwache Buttersäuregärung; (b) = sehr schwache Buttersäuregärung.

Besonders deutlich geht aus der Tabelle der Einfluß der Buttersäuregärung auf das Azotobakterwachstum und damit auf die Höhe der Gesamtstickstoffbindung hervor. Das Auftreten starker Buttersäuregärung schloß gutes Azotobakterwachstum aus und drückte den Stickstoffgewinn herunter.

Die 9 Böden unterschieden sich in den an gleichen Tagen ermittelten Durchschnittswerten an gebundenem Stickstoff oft beträchtlich.

Bei den mit Lehmböden von Parz. 8 und 5 geimpften Kolben konnte schon nach 2 Tagen eine starke Azotobakterentwicklung festgestellt werden. Die Kolben von Parz. 2 zeigten einen Tag später dasselbe Bild. Die Häutchen waren von Anfang an ziemlich dunkel und blieben verhältnismäßig dünn. In den Kolben von Parz. 8 und 5 trat am 8. Tage die bereits erwähnte Begleitflora von kleinen Kurzstäbchen auf, bei Parz. 2 einen Tag später.

In den Kolben mit Sandböden konnten erst am 3. Tage nach der Einleitung der Versuche sehr kleine Azotobakterzellen beobachtet werden. Eine sichtbare Häutchen-

bildung konnte von den Kolben von Parz. 7 zu Beginn des 5. Tages, von Parz. 4 am Ende des 5. Tages festgestellt werden. Bei Parz. 1 verzögerte sich die Häutchenbildung bis zum 9. Tage. Trotz nur schwacher Buttersäuregärung unterblieb bei ihr bis zu diesem Tage weiteres Azotobakterwachstum, um dann am 9. Tage spontan einzusetzen. Diese Wachstumshemmung zwischen dem 5. und 9. Tage bedingte den nur geringfügigen Stickstoffzuwachs von 0,70 mg. Gegen Ende des Versuches wurden die Hautchen von den mit Sand beimpften Kolben ziemlich dick und runzlig. Pigment bildeten sie nicht. Am 10. Tage konnte in den Sandkolben von Parz. 7 und 4 eine üppige Begleitflora festgestellt werden, die, wie bei den Lehmböden, vorwiegend aus kleinen Kurzstäbchen bestand.

Die Moorerden verhielten sich abweichend. Die Kolben von Parz. 9 und 6 zeigten am 6. Tage eine starke Buttersäuregärung neben schwacher Azotobakterentwicklung. Diese setzte in stärkerem Maße bei Parz. 6 erst am 10. Tage ein, verbunden mit der Bildung eines dünnen, schwarzen Azotobakterhäutchens. In den Kolben der Parz. 9 konnte keine wesentliche äußerliche Veränderung mehr wahrgenommen werden. Mikroskopisch wurde eine etwas stärkere Ansammlung von Azotobakterzellen nach dem 10. Tage beobachtet, die Zellen waren jedoch durchweg sehr klein. Bei den mit Moorerde von Parz. 3 geimpften Kolben konnte sich bis zum 15. Tage kein Azotobakter entwickeln, nach 9 Tagen trat eine schwache Buttersäuregärung auf.

Vergleicht man diese bakteriologischen Befunde mit den täglich ermittelten Mengenwerten gebundenen Stickstoffs, so kommt man zu folgenden Feststellungen:

1. Der Beginn der Stickstoffbindung fällt mit dem Auftreten und der Vermehrung der Stickstoffsammler, vorwiegend Azotobakter, zusammen, die demnach sofort ihre stickstoffbindende Tätigkeit aufzunehmen scheinen.

2. Nachdem genügend Azotobakter in die über den Bodenproben stehende Nährflüssigkeit gewandert ist und sich dort hinreichend vermehrt hat, kommt es zur Bildung der Kahmhaut, die den Beginn der Intensitätsperiode anzeigt.

3. Die Entwicklung des Azotobakterhäutchens kommt im allgemeinen nach 2—3 Tagen zum Stillstand. Von diesem Zeitpunkte ab läßt auch die intensive Stickstoffbindung nach.

4. Das Auftreten einer üppigen Begleitflora fällt zeitlich zusammen mit der nochmaligen Zunahme der Stickstoffbindung.

Auf das Bestehen eines Zusammenhanges zwischen Azotobakterwachstum und Stickstoffbindung ist schon verschiedentlich hingewiesen worden.

So stellten A. Koch und S. Seydel (39) nach dem 8. Tage keine wesentlichen Zunahmen an gebundenen Stickstoff fest. Die Höhe der Stickstoffbindung ist nach ihrer Ansicht vom Alter der Kultur abhängig. Christensen (40) beobachtete trotz abweichender Versuchsbedingungen ein fruhes Eintreten der Azotobakterentwicklung bei neutralen und schwach alkalischen Böden. H. Grollmitz (41) stellte Unterschiede im Stickstoffgehalt innerhalb der einzelnen Parallelversuchskolben fest. Trotz ganz anderer Versuchsbedingungen ergibt sich aus seinen Kurven, daß die Stickstoffbindung durchaus nicht gleichmäßig verläuft. Sie stieg bei seinen Versuchen bis zum 10. Tage stark an, um von da ab ziemlich gleichmäßig zu verlaufen. Seiner Meinung nach gehen Azotobakterentwicklung und Stickstoffbindung parallel. Schließlich konnte er auch eine Beeinflussung der Begleitflora feststellen.

Inwieweit die zwischen dem 8. und 11. Tage aufgetretene Begleitflora an der nochmaligen Erhöhung der Stickstoffbindung beteiligt war, ist nicht sicher zu beantworten. Es besteht einmal die Möglichkeit, daß sich unter der Begleitflora Stickstoffsammler befunden haben, etwa B. radiobakter oder andere Arten der Gruppe Friedländer[1]), oder die aufgetretene Begleitflora hat auf die ursprünglichen Stickstoffsammler einen Reiz ausgeübt, der diese zur nochmaligen Leistungssteigerung angetrieben hat. Da

[1]) Vgl. Löhnis-Glathe (42).

die Stickstoffgewinne nicht erheblich waren, wurden keine näheren Untersuchungen darüber angestellt.

Zwischen den Ergebnissen der täglichen Stickstoffbindung und dem Wachstum der Stickstoffsammler in den einzelnen Kolben der Anreicherungsversuche, besonders von Azotobakter, bestehen Zusammenhänge, wie auch die oben erwähnten Arbeiten erweisen. Unter besonderer Berücksichtigung des Azotobakterwachstums scheint es nach den vorliegenden Ergebnissen so zu sein, daß sich die Azotobakterzellen zunächst teilen und vermehren, ohne in dieser Zeit erhebliche Stickstoffmengen aus der Luft zu binden. Die verstärkte Stickstoffbindung wurde in dem Augenblick beobachtet, als die kleinen Teilzellen wuchsen und als sich das typische Azotobakterhäutchen bildete. Neben diesem Vorgang des Zellenwachstums und der Zellvergrößerung ging die weitere Teilung einher. Zu Beginn der Intensitätsperiode konnten Unterschiede in der Zellgröße am häufigsten beobachtet werden, am Ende der Periode weniger. Praktisch werden die Phasen der Teilung und der Zellvergrößerung bzw. Häutchenbildung ineinander übergehen.

Die Ausführungen zeigen, daß die Ergebnisse der monatlichen und täglichen Stickstoffbindung als die Leistungen verschiedener bodenständiger Azotobakterrassen zu erklären sind. Die Bedeutung einer solchen Rasse kommt der stickstoffbindenden Kraft des betreffenden Bodens gleich und kann im Laboratorium an folgenden Merkmalen erkannt werden:

1. die Schnelligkeit der Entwicklung und der Zellteilung;
2. zeitiges Auftreten der Intensitätsperiode;
3. die Höhe der Stickstoffbindung während dieser Periode;
4. der Endwert an gebundenen Stickstoff.

Für die Beurteilung und die Auswertung der Ergebnisse ist die Frage der Versuchsdauer wichtig, da sich die einzelnen Böden hierin verschieden verhalten.

Für neutrale oder schwach alkalische Böden wie die verwendeten Mineralböden scheint die Stickstoffbindung nach dem 10. oder 11. Tage beendet zu sein, so daß die Versuche zu diesem Zeitpunkt abgebrochen werden konnen. Saure Boden scheinen nach vorliegenden Erfahrungen eine Verlängerung der Versuchsdauer erforderlich zu machen. Freilich ergeben sich damit in der Praxis Schwierigkeiten, sobald neben neutralen oder schwach alkalischen auch saure Böden verglichen werden sollen, wie es in der vorliegenden Arbeit der Fall war. Ihre Ergebnisse lassen keine Rückschlüsse zu, wieviel Stickstoff z. B. während der Intensitätsperiode gefunden worden ist, da diese unter Umständen gar nicht erfaßt wurde. Das Verfahren vermag zudem keinen Aufschluß über den Charakter der einzelnen bodenständigen Azotobakterrassen zu geben, der vom Endwert mehr oder weniger unabhängig ist. Dies beweist das Verhalten von Parz. 1 und 5 am 10. Tage, ferner der geringe Abstand der Mineralböden am 15. Tage mit einer Differenz von nur 1,77 mg assim. N. So lassen sich auch die geringen Wertunterschiede von Bihler (37) erklären, der eine Versuchsdauer von 3 Wochen einhielt. Bis zum Ende dieser langen Versuchszeit haben sich die Unterschiede mehr oder weniger verwischt.

Versucht man die Ergebnisse der monatlich gemessenen Stickstoffbindung unter diesen neuen Gesichtspunkten zu betrachten und zu werten, so ergibt sich in Ergänzung der auf S. 19 ff. gemachten Ausführungen folgendes: Die geringe Stickstoffbindung der Parzelle 1 in den Monaten Februar, Juni und Juli ist zu erklären durch Wachstumshemmungen des bodenständigen Azotobakters unter äußeren Einwirkungen, besonders des jahreszeitlichen Rhythmus und der Trockenheit. Das Wachstum ist derart verzögert worden, daß der am 10. Tage unterbrochene Versuch die Inten-

sitätsperiode scheinbar nicht miterfaßt hat, was erst der Fall gewesen wäre, wenn der Versuch einige Tage später beendet worden wäre. Das Ergebnis wäre dann wohl auch höher ausgefallen. Ähnlich scheinen die Verhältnisse im Juli bei den Parzellen 4 und 7, 2 und 5 gelegen zu haben. Die betreffenden bodenständigen Azotobakterrassen scheinen durch die vorhergegangene Trockenheit stark geschädigt und in ihrer Leistungsfähigkeit beeinträchtigt worden zu sein. So ist die weitere Verzögerung des Wachstums im Juli durch eine zeitliche Verschiebung der Intensitätsperiode zu erklären. Die Intensitätsperiode scheint bei den genannten Böden im Juli zum mindesten nicht voll erfaßt worden zu sein im Gegensatz zu Parzelle 8, die sich merklich abhebt. Der jahreszeitliche Rhythmus hat natürlich auch eine gewisse Erniedrigung der absoluten Werte bewirkt, seine Einwirkung scheint sich aber vorwiegend in einer Wachstumsverzögerung und einem Hinausschieben des normalen Entwicklungsrhythmus geäußert zu haben. Die noch zu erörternden analogen Versuche über den täglichen Verlauf der Salpeterbildung stützen diese Auffassung. Das Verhalten von Parzelle 2 von August ab wäre durch die Nachwirkung einer Schädigung des Azotobakters zu erklären, die sich ebenfalls in einer Entwicklungsverzögerung und der Erniedrigung der absoluten stickstoffbindenden Leistungsfähigkeit ausdrückt. Das eigenartige, sprunghafte Verhalten von Parzelle 6 würde auch in diesen Rahmen passen. Es ist anzunehmen, daß die für Parzelle 6 charakteristische, spontan auftretende Intensitätsperiode (vgl. graph. Darst. 8) in den Monaten Februar, Mai, Juli, Oktober und November überhaupt nicht, im Juni vielleicht nur teilweise erfaßt worden ist durch eine zu frühe Versuchsunterbrechung am 10. Tage. Andererseits ist es aber auch möglich, daß die hohe Wasserstoffionenkonzentration und die dadurch mitbedingte Buttersäuregärung ein Azotobakterwachstum in den restlichen Monaten nicht hat aufkommen lassen.

Aus den Ausführungen ist der Schluß zu ziehen, daß eine bestimmte Umwelt (Bodenbeschaffenheit, Wasserstoffionenkonzentration, Klima) ganz bestimmte Azotobakterrassen hervorbringt. Die Umwelt würde also der hauptsächlich bestimmende Faktor sein. In zweiter Linie übt der jahreszeitliche Rhythmus auf die Vorgänge eine bestimmende Wirkung aus, indem er die Leistungsfähigkeit der bodenständigen Azotobakterrasse steigert oder mindert und ein schnelles oder langsames Ablaufen des Entwicklungsrhythmus zuläßt und festsetzt.

d) Beziehungen zwischen Stickstoffbindung und Ertrag.

Zwischen Stickstoffbindung durch Azotobakter und Ernteerträgen konnten bisher keine sicheren Beziehungen festgestellt werden, da als Maßstab der stickstoffbindenden Kraft eines Bodens der Endwert an gebundenem Stickstoff galt. Die vorliegende Arbeit würde unter dieser Voraussetzung zum gleichen Ergebnis führen wie die folgende Zusammenstellung der entsprechenden Durchschnittsverhältniswerte von Stickstoffbindung und Ertrag zeigt (Tab. 10).

Die Zahlen zeigen, daß die Abweichungen der Verhältniszahlen zwischen Ertrag und Stickstoffbindung ähnlich denen zwischen Ertrag und Keimgehalt anstiegen, je einseitiger und ungünstiger die Böden waren. Da aber an Hand der Untersuchungen über die tägliche Stickstoffbindung nachgewiesen werden konnte, daß neben dem Endwert vor allem die Entwicklung

wichtig ist, die zu diesem Endwert geführt hat, konnten unter Berücksichtigung dieser neuen Gesichtspunkte Beziehungen zwischen Stickstoffbindung und Ertrag festgestellt werden.

Tabelle 10. Beziehungen zwischen Stickstoffbindung und Erträgen.

Boden	Durchschnitt der Ertragsverhältniszahlen 1928/29 (Parz. 8 = 100)	Jahresdurchschnitt der Stickstoffbindung von 1930 (Parz. 8 = 100)
Sandparzelle 1 . . .	26,0	57,3
,, 4 . . .	23,2	77,6
,, 7 . . .	52,3	88,9
Lehmparzelle 2 . . .	66,6	78,5
,, 5 . . .	73,1	88,0
,, 8 . . .	100,0	100,0
Moorparzelle 3 . . .	22,6	7,1
,, 6 . . .	37,3	29,2
,, 9 . . .	92,4	27,7

Betrachtet man den täglichen Stickstoffbindungsvorgang bei den Mineralböden am 11. Tage als im wesentlichen abgeschlossen, errechnet die durchschnittliche Tagesleistung und vergleicht, wieviel die einzelnen Böden am Schlusse der Intensitätsperiode über oder unter dem an diesem Tage gültigen theoretischen Mittelwert liegen, so ergeben sich zahlenmäßige Anhaltspunkte, die sowohl die Reihenfolge der Böden nach dem Ertrage der beiden vorhergehenden Jahre als auch den Abstand der einzelnen Böden untereinander gut wiedergeben. Tabelle 11 soll dieses Bewertungsverfahren erklären und belegen.

Tabelle 11. Stickstoffbindung und Ernteerträge.

Parz. Nr.	Tagesdurchschnitt an assim. N in mg	Ende der Int.-Per. (Tag)	Theoretischer Mittelwert am Ende der Int.-Per. in mg assim. N	Tatsächliche Menge an assim. N in mg	Differenz in mg assim. N	Ertragsverhältnis-Zahl (Parz. 8 = 100)
8	0,60	4.	2,40	4,57	+ 2,17	100
5	0,50	4.	2,00	3,73	+ 1,73	73,1
7	0,63	6.	3,78	4,95	+ 1,17	52,3
2	0,47	5.	2,35	3,41	+ 1,06	66,6
4	0,58	6.	3,48	3,92	+ 0,44	23,2
1	0,53	10.	5,30	5,18	— 0,12	26,0

Die Anwendbarkeit dieses noch unvollständigen Berechnungsverfahrens muß sich natürlich auf azotobakterhaltige Böden beschränken, deren p_H-Wert 6,0 nicht unterschreitet.

3. Salpeterbildung.

a) Methodik.

Die monatlich entnommenen Bodenproben der 9 Parzellen wurden zunächst an der Luft getrocknet. Dann wurden je 5 g eines jeden Bodens in je 5 sterile Erlenmeyerkolben (300 ccm) gebracht und mit je 50 ccm einer Nährlösung überschichtet, die folgende Zusammensetzung hatte:

Bodenauszug nach Löhnis	100 ccm
Ammoniumsulfat	0,1 g
Dikaliumphosphat	0,1 g

Hierauf wurde in jeden Kolben eine Messerspitze kohlensauren Kalks gegeben. Dann wurden je 4 Kolben bei 22° C bebrütet, je 1 Kolben diente der sofortigen Nitratbestimmung. Nach 28 Tagen erfolgte dann die Bestimmung des nitrifizierten Ammonstickstoffs nach der Phenoldisulfonsäuremethode (43).

b) Ergebnisse.

Die prozentualen Durchschnittswerte der nitrifizierten Ammonstickstoffmengen der 9 Böden sind in Abb. 9—11 graphisch dargestellt und geben über den Verlauf der Salpeterbildung ein charakteristisches Bild.

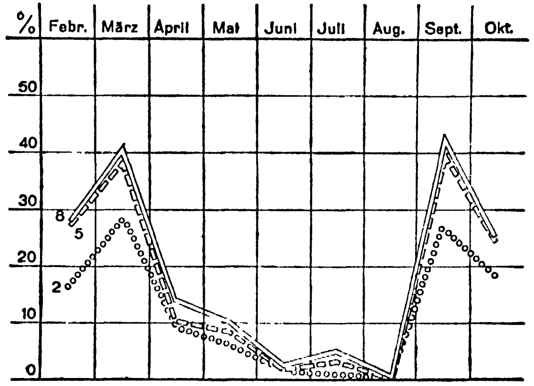


Abb. 9. Salpeterbildung aus Ammonsulfat in Prozent des zugesetzten Ammoniakstickstoffs. Bodenmenge: 5 g (Lehmböden).

c) Auswertung der Ergebnisse.

Bei den einzelnen Böden heben sich deutlich je zwei ausgesprochene Höhepunkte heraus, einer im Frühjahr, einer im Herbst. Unter den Lehmböden erzielte Parzelle 8 die höchsten Ergebnisse, dann folgte Parzelle 5; Parzelle 2 fiel im Februar, März und September etwas ab, also gerade während der Zeit der Höchstleistung. Sonst war der Verlauf der Salpeterbildung bei den Lehmböden ziemlich regelmäßig und ausgeglichen. Unter den Sandböden hielt sich Parzelle 7 an der Spitze. Im Boden der Parzelle 1 war während der Zeit der höchsten Leistung mehr Ammonstickstoff nitrifiziert als in dem von Parzelle 4, sonst weniger. Bemerkenswert ist, daß Parzelle 1 in der Durchschnittsleistung abfiel, da sie in den Monaten Mai bis Juli und September bis Oktober ihre Nitrifikationsfähigkeit nahezu einstellte. Dies bewirkte, daß der Verlauf der monatlichen Salpeterbildung bei den Sandböden unregelmäßiger und unausgeglichener war. Der Verlauf der Salpeterbildung bei den Moorerden hat sich abweichend gestaltet. Auffällig ist das zeitliche Auseinanderliegen der Maxima. Sieht man von dem etwas späteren Eintreten des Frühjahrsmaximums von Parzelle 6 ab und vergleicht die absoluten Leistungen, so ergibt sich eine starke Übereinstimmung von Parzelle 9 und 6, die in ihrem Salpeterbildungsvermögen nur geringe Unter-

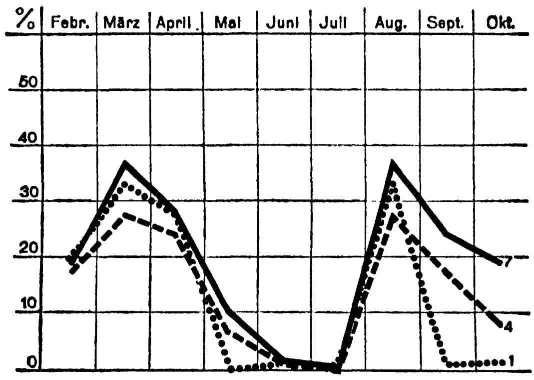


Abb. 10. Salpeterbildung aus Ammonsulfat in Prozent des zugesetzten Ammoniakstickstoffs. Bodenmenge: 5 g (Sandböden).

schiede aufwiesen. Parzelle 3 fiel völlig ab, ihre Höchstleistungen im Mai und Oktober waren verhältnismäßig gering, aber doch deutlich ersichtlich. Vergleicht man die Höchstwerte der 9 Böden im Frühjahr und Herbst, so ergibt sich folgendes Bild:

Tabelle 12.
Vergleich der Frühjahrs- und Herbstmaxima in Prozent nitrifizierten Ammonstickstoffs.

Boden	Frühjahrs-maximum	Herbst-maximum	Differenz beider Maxima
Sandparzelle 1	33,90	33,81	— 0,09
,, 4	28,00	28,00	± 0
,, 7	37,33	37,81	+ 0,48
Lehmparzelle 2	28,57	26,91	— 1,66
,, 5	39,52	40,20	+ 1,68
,, 8	41,24	43,04	+ 1,80
Moorparzelle 3	11,05	4,81	— 6,24
,, 6	50,34	55,00	+ 4,66
,, 9	51,73	59,14	+ 7,41

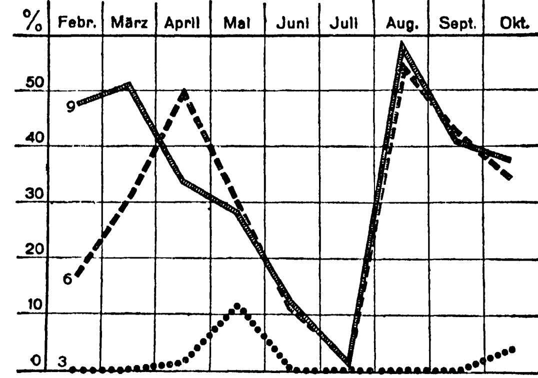


Abb. 11. Salpeterbildung aus Ammonsulfat in Prozent des zugesetzten Ammoniakstickstoffs. Bodenmenge: 5 g (Moorerden).

Die Übereinstimmung der Höchstwerte bei den Mineralböden, besonders den Sandböden, war sehr gut, bei den Moorerden leidlich.

Innerhalb der Gesamtergebnisse sind die verhältnismäßig hohen Werte der Moorerden auffällig, vor allem von Parz. 9 und 6. Hier ist zu berücksichtigen, daß die angewandte kolorimetrische Phenoldisulfonsäuremethode zur Bestimmung des Nitratgehalts in stark humushaltigen Böden oft ungenau arbeitet infolge Verfärbungen durch organische Substanzen. M. J. Plice (44) hat dieselben Beobachtungen gemacht und betont, daß die Fehlerquelle bei niedrigem Nitratgehalt oft beträchtlich werden könne, während sie bei hohem Nitratgehalt nicht so in Erscheinung trete und vernachlässigt werden könne. In der vorliegenden Arbeit ist anzunehmen, daß die verhältnismäßig hohen Nitrifikationswerte der beiden erwähnten Moorerden z. T. auf die Ungenauigkeit der kolorimetrischen Bestimmungen zurückzuführen ist. Bei den Mineralböden hat das Verfahren befriedigend gearbeitet, ihre Nitrifikationswerte sind daher nur unter Vorbehalt mit denen der Moorerden zu vergleichen.

Die Frage nach den Faktoren, die die Salpeterbildung bestimmen und beeinflussen, ist verschieden beantwortet worden.

S. A. Waksman (19) gibt nachstehende Reihenfolge der Faktoren nach ihrer Bedeutung an: Temperatur, Sauerstoff, günstige Feuchtigkeit, p_H-Wert über 4,6, Anwesenheit von Puffersubstanz, Abwesenheit von kohlenstoffhaltigen Stoffen. Nach seiner Ansicht findet noch bei p_H 4,0 eine Nitrifikation statt, Waksman betont jedoch, daß die Pufferwirkung wesentlicher als die absolute p_H-Zahl sei (45). O. Meyerhof (46) hat den Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Salpeterbildung untersucht und gibt an als

untere Grenze . . . . 5,6 p_H
Optimum . . . . 8,4 p_H
obere Grenze . . . . 10,2 p_H.

Arndt (47) konnte auf Moorböden kein Wachstum von Nitratbakterien feststellen. A. E. Traaen (48) behauptet, die Frage der Abhängigkeit der Nitrifikation von der Wasserstoffionenkonzentration sei noch nicht restlos geklärt. C. S. Meek und C. B. Lipman (49) haben eine Nitratbildung auf sauren Böden beobachtet und erklären sie durch die Anpassungsfähigkeit der Nitratbakterien durch allmähliche Gewöhnung. F. Löhnis und H. Glathe (42) betonen, daß die Feuchtigkeit einen starken Einfluß ausübt und daß in feuchten Sandböden oft eine bessere Salpeterbildung eintritt als in Lehm- oder Tonböden. Neben der Feuchtigkeit und der Bodenart spiele auch die Temperatur eine Rolle. Bis 5° C verlaufe der Umsetzungsvorgang langsam, bei 12° deutlich, bei 37° erreiche er sein Optimum. Nach ihrer Meinung übt aber der jahreszeitliche Rhythmus eine bestimmende Einwirkung auf den Verlauf der Salpeterbildung aus. So glaubte Löhnis bei seinen im sehr trockenen Sommer 1904 durchgeführten Versuchen den beobachteten Abfall der Nitratbildung nicht allein durch den Mangel an Feuchtigkeit erklären zu können, sondern schloß auf eine „jahreszeitliche" Einwirkung. Diese Auffassung konnte er durch spätere Arbeiten (11, 12) belegen. Trotz niedriger Temperatur konnte er bei 2° C ein Ansteigen der Intensitätskurve feststellen. Neben Löhnis machten später Müntz und Gaudechon (14) auf „jahreszeitliche" Schwankungen aufmerksam. S. Limbach (50) kam zu derselben Feststellung. Er beobachtete bei seinen Nitrifikationsversuchen der Versuchsreihe I mit 3 verschiedenen Böden geringe Abweichungen der Kurven, die nach seiner Ansicht „in unvermeidlichen kleinen Ungenauigkeiten beim experimentellen Arbeiten begründet sein dürften", daß also die Differenzen nur als methodische Fehler und nicht als Bodenfrage aufzufassen seien. Auf Grund vorliegender Untersuchungen kann man dieser Ansicht Limbachs nicht beipflichten, da die Unterschiede innerhalb der 3 Bodenarten sehr wohl und teilweise sogar deutlich auftraten.

Im vorliegenden Falle läßt sich folgendes sagen: Deutlich ersichtlich ist die bestimmende Einwirkung des jahreszeitlichen Rhythmus, wofür der Verlauf auf sämtlichen 9 Böden eindeutig spricht. Der jahreszeitliche Rhythmus als bestimmender Faktor muß bei der Nitratbildung derartig stark gewesen sein, daß trotz des einseitigen und wechselnden Witterungsverlaufes dieser in den Ergebnissen und Kurven der Salpeterbildung kaum zum Ausdruck kommt.

Im allgemeinen hat vermutlich die hohe Wasserstoffionenkonzentration bei Parzelle 3 eine höhere Nitrifikation verhindert, da die untere Grenze, bei der eine Nitrifikation überhaupt möglich ist, bereits unterschritten war. Die Einwirkung des jahreszeitlichen Rhythmus hat bei Parzelle 3 zwei deutliche, wenn auch schwache Maxima hervorrufen lassen. Im übrigen hat sich bei den anderen Böden ein Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration nicht geltend gemacht, da diese bei den Mineralböden innerhalb optimaler Grenzen lag, und bei den Moorerden von Parzelle 9 und 6 die untere Grenze nicht unterschritten wurde. Ein Einfluß der Temperatur ist ebenfalls nicht ersichtlich. Eine evtl. hemmende Wirkung niedriger Temperaturen wird dadurch widerlegt, daß im März Höchstleistungen beobachtet werden konnten. Ein Einfluß der Feuchtigkeit ist nicht unmittelbar zu erkennen, immerhin scheinen zwischen jahreszeitlichem Rhythmus, Feuchtigkeit, Luftzufuhr und Nitrifikation gewisse Beziehungen zu bestehen. So ist es auffällig, daß die leichter trocknenden Sandböden nach der starken Nässe bereits im August ihr Herbstmaximum erreichten. Die Feuchtigkeit scheint dieses nicht erwartete frühe Eintreten der Intensität von Nitratbildung eher noch begünstigt zu haben. Bei den Lehmböden hat die Nässe die Entwicklung nicht gefördert; erst nach einer Abtrocknung der Lehmböden trat bei diesen die Intensität der Salpeterbildung ein. Ähnlich lagen die Verhältnisse bei den Frühjahrsmaxima der Moorerden.

Harder (51) ist der Ansicht, daß vorwiegend der Luftzutritt die Salpeterbildung bestimmt und sagt weiterhin: „Es liegt eine Periode der Umwelt vor, also des Bodens, seiner Feuchtigkeit und vor allem seines Sauerstoffgehalts." Harder er-

hielt in verschiedenen Jahreszeiten Ausschläge und streitet auf Grund seiner Ergebnisse eine Einwirkung des jahreszeitlichen Rhythmus ab. Es gäbe bei der Nitrifikation keine „endonome Periode". Seine Auffassung wird durch die vorliegenden Ergebnisse nicht bestätigt.

Die Umwelt des Bodens, dessen Feuchtigkeitsgehalt und Sauerstoffgehalt haben die Ergebnisse nicht bestimmt, sonst müßte erstens der Verlauf der Kurven während des Versuchsjahres unregelmäßiger sein, zweitens müßten die Kurven der Lehm- und der Sandböden erhebliche Abweichungen voneinander aufweisen wegen des grundverschiedenen Verhältnisses dieser beiden Bodengruppen gegenüber der Feuchtigkeit und der damit zusammenhängenden Luftzufuhr. Dies ist beides nicht eingetreten. Im Gegenteil spricht der Verlauf der Salpeterbildung bei den mineralischen Böden unbedingt für eine bestimmende Einwirkung des jahreszeitlichen Rhythmus, der durch Feuchtigkeit und Luftzufuhr nur beeinflußt werden konnte, wie die oben bereits besprochenen Ergebnisse von August und September zeigten.

Um ein Bild über die Entwicklung der Salpeterbildung in den einzelnen Kolben bis zum 28. Tage zu erhalten, wurden je 3 Kolben am 5., 10., 15., 20., 25. und 28. Tage auf tägliche Salpeterbildung untersucht. Der Versuch wurde im September durchgeführt, die einzelnen Ergebnisse des Verlaufs sind in Tab. 13 zusammengestellt.

Tabelle 13. Salpeterbildung in Prozent des nitrifizierten Ammon-N in je 5 g Erde.

Tag	Sandböden			Lehmböden			Moorerden		
Parz.:	1	4	7	2	5	8	3	6	9
5.	0	0	0	0,38	0,48	0,57	0	0	0
10.	0	0	0	0,67	0,61	0,86	0	0	0
15.	0	0	0	0,85	0,95	0,96	0	0,11	0,15
20.	0,10	0,10	0,95	2,95	3,14	3,12	0	5,41	6,79
25.	0,43	0,51	16,95	24,90	35,91	35,09	0	38,45	39,21
28.	1,43	17,81	24,29	26,91	40,20	43,04	0	43,40	41,21

Der Versuch hat das Herbstmaximum nur bei den Lehmböden erfaßt. Die Salpeterbakterien der Lehmböden nahmen sofort ihre Tätigkeit auf, zwischen dem 20. und 25. Tage setzte eine sehr intensive Nitrifikation ein. Bemerkenswert ist, daß der Umsetzungsvorgang bei Parzelle 2 eher abgeschlossen war. Hier liegt eine offensichtliche Hemmung vor, die in der Eigenart und der geringeren Leistungsfähigkeit der bodenständigen Salpeterbildner begründet sein dürfte und die auch die geringe Salpeterbildung der Parzelle während des ganzen Jahres erklärt. Bei den Sandböden wurde das Herbstmaximum nicht erfaßt; die Endwerte sind daher auch bedeutend geringer und dürfen in diesem Zusammenhang mit denen der Lehmböden nicht ohne weiteres verglichen werden. Die Entwicklung und Intensität der Salpeterbildung hat später eingesetzt, besonders bei den Parzellen 4 und 1. Bei Parzelle 1 ist die Intensitätsperiode nicht erfaßt worden; die geringe, aber deutliche Leistungssteigerung zwischen dem 25. und 28. Tage dürfte darauf hinweisen, daß die Intensitätsperiode bei Parzelle 1 begann, ähnlich wie bei den anderen Böden. Die Ergebnisse der Nitratbildung der 3 Moorerden sind mit angeführt, ohne sie auf Grund der methodischen Ungenauigkeiten weiter auszuwerten.

Das Gesamtbild der jährlichen Umsetzungsprozesse ist nach diesen Beobachtungen erklärbar. Die festgestellten Höchstleistungen im März und

August/September sind bedingt gewesen durch schnellere Entwicklung der Salpeterbakterien und zeitlich früheres Eintreten der Intensität, beides bestimmt durch die Einwirkungen des jahreszeitlichen Rhythmus auf die Salpeterbildung.

Die salpeterbildende Kraft eines Bodens ist hiernach erkennbar an folgenden Merkmalen:

1. Schnelligkeit der Entwicklung der Salpeterbildner,
2. zeitiges Auftreten der Intensitätsperiode,
3. die insgesamt gebildete Salpetermenge.

Alle 3 Merkmale sind jeweils abhängig von dem jahreszeitlichen Rhythmus, eine Tatsache, die bei entsprechenden Versuchen unbedingt zu berücksichtigen ist.

Beziehungen zwischen Salpeterbildung und Ernteerträgen konnten auf Grund vorliegender Ergebnisse nicht festgestellt werden.

Zusammenfassung.

Die teilweise starken Unterschiede der 9 Bodentypen kamen bei allen mikrobiologischen Untersuchungen klar zum Ausdruck. Dabei konnte beobachtet werden, daß die Umsetzungen in den extremen Böden häufig unausgeglichener verliefen als in den anderen.

Die mit Hilfe von Plattengußverfahren und Verdünnungsmethode durchgeführten Keimzählungen zeigten charakteristische Unterschiede der verschiedenen Bodentypen an. Dabei war die Übereinstimmung der Ergebnisse beider Methoden im Frühjahr und Herbst gut, im Sommer schlecht. Die die Keimzahl bestimmenden und beeinflussenden Faktoren konnten nach ihrer Bedeutung in keiner bestimmten Reihenfolge geordnet werden. Vielmehr war nachzuweisen, daß die einzelnen Faktoren bei den verschiedenen Böden und in den einzelnen Monaten in ihren Wirkungsstärken schwankten und sich oft in ihrer bestimmenden Einwirkung ablösten. Eine Einwirkung des jahreszeitlichen Rhythmus war fast immer deutlich.

Das Stickstoffbindungsvermögen der Böden unterschied sich teilweise erheblich. Die Höhe der festgestellten Stickstoffbindung war vorwiegend bestimmt durch die Tätigkeit von *Azotobacter chroococcum* Beij., in den sauren Moorerden wurde sie häufig durch die vorherrschende Buttersäuregärung herabgesetzt. Eine kritische Untersuchung der Anreicherungsmethode ergab, daß sich die stickstoffbindende Kraft der Böden weniger in ihrem absoluten Stickstoffbindungsvermögen als in der Schnelligkeit der Entwicklung ausdrückte. Es mußte das Auftreten verschiedener bodenständiger Azotobakterrassen angenommen werden, deren Leistungsgrenzen im wesentlichen durch die Bodeneigenschaften bedingt waren. Daneben war die Leistungsfähigkeit bestimmt durch den jahreszeitlichen Rhythmus und konnte von anderen Faktoren nur dann maßgeblich beeinflußt werden, wenn diese ein bestimmtes Minimum unterschritten. Es wurde festgestellt, daß die Stickstoffbindung trotz anfänglicher deutlicher Unterschiede, in den Endwerten nur wenig voneinander abweichen kann. In solchen Fällen läßt der Verlauf der täglichen Stickstoffbindung die charakteristischen Eigenschaften wesentlich klarer erkennen. Wahrscheinlich ist *der* Boden der wertvollere, der eine rascher einsetzende Tätigkeit mit dem höheren Endwert verbindet. Die Schnelligkeit der Entwicklung und der Stickstoffbindung geht mit der Bildung der Kahmhaut

Hand in Hand. Es ist daher nicht nötig, die gebundenen Stickstoffmengen täglich zu bestimmen. Eine Stickstoffbestimmung bei beginnender Kahmhautbildung bzw. 2 Tage nach diesem Zeitpunkt würde außer der Bestimmung nach 10 Tagen genügen, die bisher verwendete Methode wertvoll ergänzen und Unterschiede einander nahestehender Böden klarer werden lassen.

Das Salpeterbildungsvermögen der verschiedenen Böden zeigte geringere Unterschiede. Der jahreszeitliche Rhythmus wirkte auf die Höhe und die Intensität der Salpeterbildung stark und deutlich ein und bestimmte den zeitlichen Verlauf des Nitrifikationsprozesses in den einzelnen Anreicherungsversuchsgefäßen. Steigende Einwirkung des jahreszeitlichen Rhythmus beschleunigte den Prozeß, sinkende hemmte ihn. Daneben schien die Salpeterbildung in den verschiedenen Böden durch die Leistungsfähigkeit der betreffenden bodenständigen Salpeterbildner bestimmt zu werden.

Allgemeingültige Beziehungen zwischen Ertragshöhe und Endwerten der mikrobiologischen Vorgänge und Umsetzungen konnten im allgemeinen nicht abgeleitet werden. Unter Einbeziehung der Schnelligkeit der Entwicklung konnten zwischen dem Verlauf der täglichen Stickstoffbindung und der Ertragshöhe verhältnismäßig gute Übereinstimmungen festgestellt werden. Diese waren im ganzen bei den neutralen Mineralböden und der stark sauren, ungedüngten Moorerde gut, bei den gekalkten und basisch gedüngten sauren Moorerden schlecht. Demnach liegen die Optima von Pflanzen- und Bakterienentwicklung ungefähr auf einer Ebene, das Minimum für die Pflanzenentwicklung scheint aber bedeutend tiefer zu liegen als das der Bakterien.

Literaturverzeichnis.

1. Löhnis, F., Landw. bakt. Prakt. Bd. 123. 1920. — 2. Kühlmorgen-Hille, G., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 74. 1928. S. 497. — 3. Remy, Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 8. 1902. S. 657—662, 728—735. — 4. Fabricius, O. und Feilitzen, O. v., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 14. 1905. S. 161. — 5. Stoeckli, A., Landw. Jahrb. d. Schweiz. Bd. 42. 1928. — 6. Rippel, A., Handbuch d. Bodenlehre, Blanck. Bd. 7. 1931. S. 259. — 7. Khalil, F., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 79. 1929. S. 93. — 8. Stoklasa, J., Fortschr. d. Landw. Bd. 2. 1927. — 9. Drewes, K., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 76. 1928. S. 114. — 10. Waksman, S. A., Fortschr. d. naturwiss. Forsch., N. F., Heft 10. 1930. — 11. Löhnis, F., Mitt. d. Landw. Inst. d. Univ. Leipzig. Bd. 7. 1905. — 12. Löhnis, F., Vorlesungen über landw. Bakteriologie. 1926. S. 387. — 13. Löhnis, F., Soil Science. Vol. 22. 1926. p. 376. — 14. Müntz et Gaudechon, Compt. rend. (Paris). T. 154. 1912. — 15. Cutler, D. W., Crump, L. M., and Sandon, H., Phil. Trans. Roy. Soc., London. Vol. 211. 1922. — 16. Thornton, H. G., and Fisher, R. A., Soil Science. Vol. 23. 1927. p. 253. — 17. Brown, P. E., and Benton, T. H., Agr. Exp. Stat. Iowa State. Coll. of Agr. and mech. Arts. Res. Bull. Vol. 132. 1930. p. 363. — 18. Christensen, H. R., Soil Science. Vol. 15. 1933. — 19. Waksman, S. A., Principles of Soil microbiology. 1931. — 20. Wenzel, H., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 89. 1934. S. 353. — 21. Löhnis, F., Vorlesung über landw. Bakteriologie. 1926. S. 172, 370. — 22. Löhnis, F. und Pillai, N. U., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 20. 1908. S. 781. — 23. Löhnis, F. und Westermann, Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 22. 1908. S. 234. — 24. Haselhoff, E. und Liehr, O., Landw. Versuchsstat. Bd. 102. 1924. — 25. Gainey, P. L., Journ. Agr. Res. Vol. 14. 1918. p. 265. — 26. Gainey, P. L., Abstr. of Bact. Vol. 6. 1922. p. 14—15. — 27. Gainey, P. L., Journ. Agr. Res. Vol. 24. 1923. p. 289—296, 907—938. — 28. Gainey, P. L., Soil Science. Vol. 20. 1925. p. 73. — 29. Gainey, P. L., Act. 4. Conf. internat., Pédol. Rom. 1924. — 30. Lundegardh, H., Klima und Boden. 1925. S. 306. — 31. Nicklas, H. und Hirschberger, Ztschr. f. angew. Chemie. Bd. 57. 1924. S. 955. — 32. Nicklas, H., Poschenrieder, H. und Hock, A., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 66. 1926. S. 16. — 33. Nicklas, H. und Poschenrieder, H., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 71. 1927. S. 251. — 34. Löhnis, F., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 14. 1905.

S. 82. — 35. Löhnis, F., Handb. d. landw. Bakt. 1910. — 36. Kießling, L., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 79. 1929. S. 413. — 37. Bihler, C., Diss. T. H. München. 1927. — 38. Butenschön, H., Diss. T. H. München. 1929. — 39. Koch, A. und Seydel, S., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 31. 1912. S. 567. — 40. Christensen, H. R., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 43. 1915. S. 1. — 41. Grollmitz, H., Diss. Weihenstephan. 1927. — 42. Löhnis, F. und Glathe, H., Handb. d. landw. Bakt. 2. Bd. 1935. — 43. Glathe, H., Diss. Leipzig. 1927. — 44. Plice, M. J., Soil Science. Vol. 33. 1932. — 45. Waksman, S. A., in: Abderhalden, Fortschr. d. naturwiss. Forsch. N. F. Heft 10. 1930. — 46. Meyerhof, O., Pflügers Archiv d. ges. Physiol. Bd. 164. 1916. — 47. Arndt, Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 49. 1919. S. 1. — 48. Traaen, A. E., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 45. 1916. S. 119. — 49. Meek, C. S., and Lipman, C. B., Journ. Gen. Physiol. Vol. 5. 1922. p. 195. — 50. Limbach, S., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 78. 1929. S. 354. — 51. Harder, A., Bot. Archiv. Bd. 31. 1931.

Referate.

Bücher, Institutsberichte usw.

Dorff, P., Biologie des Eisen- und Mangankreislaufs. 116 S., 32 Abb. Berlin SW 11 (Verlagsges. f. Ackerbau m. b. H.) 1935. Preis geb. 7,50 RM.

Die verdienstvolle Arbeit, die teils in der Biologischen Abteilung der Preuß. Landesanstalt für Wasser-, Boden- und Lufthygiene in Berlin-Dahlem, teils in der Universität Lund (Schweden) entstanden ist, behandelt im 1. Teil regional-vergleichend die für den Kreislauf des Eisens bedeutsamen Gewässertypen Smalands und Norddeutschlands. Auch Eisenproben aus den Tropen und aus Südosteuropa sind bearbeitet. Es ergab sich ein Kosmopolitismus zahlreicher Arten. Nicht nur zonal, sondern auch mikrozonal sind die Eisenorganismen in großer Artenfülle vertreten; eine Tabelle lenkt die Aufmerksamkeit auf die bisher selten gefundenen Formen. Der Chemismus des Eisenstoffwechsels wird für die Ferrokarbonate dargestellt, während eine Klärung der Frage nach der Umwandlung der Eisenhumate z. Z. noch nicht einwandfrei gelingt.

Ausführlich besprochen sind die Methoden der Eisenorganismenforschung, vor allem die für die Praxis besonders wichtige Methode der Aufwuchsträger (Glasscheiben).

In dem Abschnitt über die See- und Sumpferze findet sich eine kurzgefaßte Übersicht über die Probleme der Bildung, über die chemische Zusammensetzung, Verbreitung und Förderung der Erze sowie die Beschreibung der vom Verf. eingehender bearbeiteten Standorte. Die Spezialkarte eines schwedischen Sees zeigt die Verhältnisse an einem konkreten Beispiel.

Die Darstellung der „wasserhygienischen und wassertechnischen Auswirkungen der Eisenorganismen-Tätigkeit“ dient der Klärung aller Eisen und Mangan betreffenden Fragen in Wasserwerken und bei Mineralwässern. Maßnahmen gegen „Wasserkalamitäten“ in landwirtschaftlichen Dränagen, die nicht selten durch Eisenorganismen bedingt sind, werden vorgeschlagen.

Auch auf die Bildung von nicht biogen entstandenen Eisen- und Manganniederschlägen, insbesondere von Ortstein, der bekanntlich den Ertrag vieler Böden stark herabmindert, wird vom Verf. eingegangen.

Eine sehr ausführliche — bis 1935 nachgetragene — Bibliographie mit 305 Nummern schließt das textlich klar gefaßte und gut illustrierte Werk ab, das nicht nur für den engen Kreis der Hydrobiologen, sondern für jeden Mikrobiologen, Geologen und Landwirt von Interesse ist. Stapp.

Heimans, J., Das Genus Cosmocladium. (Aus: Kolkwitz, Pflanzenforschung. H. 18.) Jena (Verlag G. Fischer) 1935. 132 S., 8 Taf. Preis brosch. 11 RM.

Die sich auf langjährige Untersuchungen aufbauende Monographie der zu den Desmidiaceen zählenden Gattung Cosmocladium, die besonders dadurch gekennzeichnet ist, daß ihre in eine weite Gallerthülle gebetteten Zellen in charakteristischer Weise durch besondere Verbindungsstränge verknüpft sind, setzt sich eingehend mit den bisher beschriebenen Arten auseinander und überprüft dabei in zeitlicher Reihenfolge kritisch-systematisch besonders die seit Brébisson gebrachten Angaben über die Entstehungsweise der Kolonieform und die der Verbindungsstränge. Dabei kommt Verf. zu einem von der derzeitigen Lehrmeinung grundsätzlich abweichenden Standpunkt. Während nach Schröder, Lütkemüller u. a. Verff. die Ausscheidung der Stränge durch die Basalporen erfolgen soll, weist Verf. nach, daß die Verbindungsstränge von dem von der Zellwand abgestreiften Außenhäutchen gebildet werden, welches sich nicht, wie bei der üblichen Häutung der jungen Zellen bei den freilebenden Vertretern der Tribus Cosmariae, völlig loslöst, sondern an einer Seite der alten Zellhälfte fest haften bleibt, womit dann auch das Umkippen der jungen Zellen und damit der auffällige Koloniebau der Gattung in ursächlicher Beziehung steht. Die Ausscheidungen aus den siebplattenartigen Basalporengruppen hingegen liefern jene Gallerte, die die Zellhaufen umschließt, d. h. die ziemlich zähe Gallerthülle der Kolonie. Auf Grund dieser Feststellungen ergibt sich, daß ein Teil der beschriebenen Arten einzuziehen ist, so daß die Gattung nunmehr an Stelle der bisherigen 11 Arten nur noch die nachfolgenden 4: C. saxonicum, C. constrictum, C. pusillum und C. perissum enthält. Besonders hingewiesen sei noch auf das vorzügliche Bildmaterial, das einen großen Teil der bisher vorhandenen Gattungsabbildungen, sowie eine große Zahl instruktiver eigener Zeichnungen bringt. Beger (Berlin-Dahlem).

Oppenheimer, C., Die Fermente und ihre Wirkungen. Supplement-Lieferung 1. Den Haag (Verlag W. Junk) 1935. Preis 17.— RM.

Die Schwierigkeiten, mit denen das große wissenschaftliche Handbuch, eine spezifisch deutsche Erscheinung, heute zu kämpfen hat, werden an diesem Einzelfall kraß sichtbar. Obwohl das vierbändige Werk Oppenheimers „Die Fermente und ihre Wirkungen" als Standardwerk bekannt und anerkannt war und obwohl die letzte Auflage fast vergriffen war, hat der Herausgeber eine Neuauflage nicht für möglich gehalten. Der jetzt gewählte Ausweg eines Supplementwerkes, das an das Hauptwerk anschließt und nur die neu erschienene Literatur und die daraus neu gewonnenen Erkenntnisse bringt, im übrigen aber das Hauptwerk zur Voraussetzung hat, kann nicht als ideal bezeichnet und nur als Notlösung gebilligt werden.

Das Ergänzungswerk wird sich vorläufig nur auf die systematische Besprechung der einzelnen Fermente erstrecken, auf Definition und Abgrenzung der Spezifität, Vorkommen, Darstellung und Charakterisierung der Fermente; es wird also nicht die Methodik der Fermentarbeiten enthalten. Die vorliegende 1. Lieferung, „Lipasen" und „Phosphatasen", zeigt wieder den so erfreulich persönlichen Stil, die überlegene und kritische Formung des Stoffes, die die Handbücher Oppenheimers weit entfernt hält von den Gefahren einer reinen Literatur- und Zitatensammlung, auch

wenn dies auf Kosten des Umfangs geht. Trotzdem ist die Literatur bis weit in das Jahr 1935 hinein nicht nur berücksichtigt, sondern auch eingehend verwertet worden.

Das Supplementwerk wird zweifellos für jeden Biochemiker, Mikrobiologen, Pflanzen- und Tier-Physiologen ebenso unentbehrlich werden wie es das Hauptwerk war. E. Pfankuch (Berlin-Dahlem).

Oppenheimer, C., Die Fermente und ihre Wirkungen. — Supplement Lief. 2. Den Haag (W. Junk) 1935. 17 RM.

Die zweite Lieferung dieses Ergänzungswerkes bringt den 1. Teil des Kapitels Carbohydrasen, nämlich die Oligasen. Hierher gehören alle Fermente, die Glucosidbindungen in kurzen Ketten lösen, ob es nun Glukosidbindungen zwischen zwei Zuckern (Holosidasen) oder zwischen einem Zucker und einem Aglucon (Heterosidasen) sind. Besprochen werden also z. B. Saccharase, Maltase, Cellobiase, Amygdalase, „Emulsin“ u. a., während die Amylasen (als Polyasen) der 3. Lieferung vorbehalten bleiben. Es ist ein besonderes Verdienst Oppenheimers, daß außer den Eigenschaften dieser Fermente (Kinetik, optimale Wirkungsbedingungen, Hemmbarkeit und Aktivierbarkeit, Vorkommen usw.) auch die gerade hier bei den Carbohydrasen so schwierigen und verwirrenden Fragen nach Spezifität und Selbständigkeit der vielen einzelnen Fermente so unübertrefflich klar und kritisch behandelt werden. E. Pfankuch (Berlin-Dahlem).

Oppenheimer, C. und Pincussen, L., Tabulae Biologicae Periodicae. Bd. 3, Nr. 2, 3 und 4. 1934. Bd. 4, Nr. 1—4. 1935. 388 S. Berlin (Verlag W. Junk). Preis des Bandes 55.— RM. (Subskriptionspreis 48.— RM.)

In den 3 letzten Nummern des 3. Bandes der periodischen biologischen Tabellen sind behandelt von Th. A. Maaß, Schlangengifte II; E. Fernholz, Vitamin B_1, B_2, C und D; A. Butenandt, Übersicht über kristallisierte Sexual-Hormone; E. Dahne, Tierische Gifte mit Saponin-Charakter; H. A. Krebs, Atmung und Gärung in lebenden Zellen; Th. A. Maaß, Biologie und Toxikologie der chemischen Kampfmittel (von einer „Biologie“ chemischer Kampfmittel zu reden, ist durchaus unkorrekt! Der Ref.); W. Graßmann und O. Mayr, Proteasen und Amidasen; H. Ch. Oppenheimer, Kulturpflanzen: Heimat, Nutzung, Chromosomen-Zahl, botanische und technische Charakteristica.

Im 4. Band sind bearbeitet von K. G. Stern, Redox-Systeme; F. Haurowitz, Respiratorische Farbstoffe; H. Blaschke, Energetik der Kontraktion des quergestreiften Skelettmuskels; A. Niethammer, Licht, Dunkelheit und Strahlung als Faktoren bei der Samenkeimung; O. Schubert, Myriapoda; E. Putter, Blutgruppen; R. E. Mark, Die Niere; Red., Quecksilbergehalt verschiedener Stoffe; Y. Asahina, Flechten-Säuren; K. Klinke, Die im Körper weniger verbreiteten Elemente; M. Moszkowski, Menschheitsentwicklung; Th. A. Maaß, Biologie und Toxikologie der chemischen Kampfmittel II; K. Boresch, Gehalt der Pflanzen an Mineralstoffen.

Was der „Landolt-Börnstein“ für den Chemiker und Physiker, das sind die Tabulae Biologicae Periodicae für den Biologen, ein unentbehrliches Nachschlagewerk mit den wichtigsten Zahlen und Daten ohne viel Text, die sonst nur mit einem sehr erheblichen Zeitaufwand aus biologischen Handbüchern oder Quellenwerken herausgezogen werden müßten.

Stapp.

Gmelins Handbuch der anorganischen Chemie. 8. Aufl. System Nr. 4: Stickstoff. Lieferung 2. 224 S. Berlin (Verlag Chemie) 1935. Preis 35.— RM.

Die 2. Lieferung bringt als Fortsetzung der ersten (Referat siehe diese Zeitschrift Bd. 93. S. 142—143) die Verbindungen des Stickstoffs mit Wasserstoff wie Stickstoffwasserstoffsäure, Hydrazin und Ammoniak. Von letzterem sind auf 186 Seiten Synthese, darunter auch ausführlich die technischen Verfahren, Zerfall, physikalische wie optische, magnetische und elektrische Eigenschaften, elektrochemisches und chemisches Verhalten, „flüssiges Ammoniak als Lösungsmittel" und „schweres Ammoniak" abgehandelt.

Diese 2. Lieferung über Stickstoff reiht sich würdig der ersten an.

Stapp.

Wehmer, C., Die Pflanzenstoffe. (Bestandteile und Zusammensetzung der einzelnen Pflanzen und deren Produkte.) Phanerogamen, Ergänzungsband. Aus dem Nachlaß herausgegeben von H. Amelung. Jena (Verlag G. Fischer) 1935. Preis brosch. 20.— RM., geb. 21.50 RM.

Alles, was bereits über das Hauptwerk gesagt worden ist, gilt auch uneingeschränkt für dieses letzte Werk Wehmers, den Ergänzungsband, der die Literatur der letzten 5 Jahre, 1930—1934, bringt. Sehr zweckmäßig für einen solchen Nachtrag ist wieder die alphabetische Ordnung der lateinischen Gattungs- und Speziesnamen an Stelle der botanischen Systematik des Hauptwerks. Rund 1200 Pflanzennamen sind so angeführt und für jede dieser Arten sind alle erreichbaren Angaben über Isolierung und Gehalt an chemisch definierten Stoffen, alle analytischen Daten, neuerdings auch Angaben über Vorkommen von Fermenten und Vitaminen kurz referiert und mit Zitaten belegt. Die Mühe und Arbeit, die hier aufgewendet wurde, ist außerordentlich und macht diesen Ergänzungsband ebenso wie das Hauptwerk wertvoll für jeden, der mit Pflanzenstoffen zu tun hat. — Eine Fortführung dieses Werkes ist unbedingt notwendig, allerdings wäre dann zu wünschen, daß auch botanische und pflanzenphysiologische Zeitschriften unmittelbar verwertet würden und nicht nur die im chemischen Zentralblatt referierte Literatur. E. Pfankuch (Berlin-Dahlem).

Allgemeines und Methodisches.

Koch, F. E., Weiterzüchtung von Anaerobiern in Röhrchen. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 134. 1935. S. 469—472.)

Da es einfacher ist, bei der Anaerobenzüchtung mit Trockensubstanzen zu arbeiten als mit Flüssigkeiten (Methode Ritter-Dorner) wird folgendes Verfahren empfohlen: Es werden kleine Glasröhrchen (25 mm lang, 9 mm Durchmesser) mit etwas gewulstetem Rand benötigt, die in die Schrägblutagarröhrchen (14 mm Durchmesser) gut hineinpassen. Diese Röhrchen sind mit einem Faden zu versehen, der durch den gewulsteten Rand gehalten wird. Das freie Ende des Fadens ist etwa 2 cm lang. Die Gläschen werden mit Pyrogallol in Substanz und einigen Körnchen Pottasche beschickt und hierauf an dem dünnen Faden, den man mit einem Gummistopfen (25 mm lang, 18 mm oberer Durchmesser, 14 mm unterer Durchmesser) festhält, beim Verschließen in das Kulturröhrchen eingebracht. Das Fadenende muß vollständig im Röhrchen verschwinden. Beim Öffnen der Kultur wird mit dem Gummistopfen auch der Faden und das Pyro-

gallolgläschen herausbefördert. Einzelheiten über die Technik sind im Original nachzulesen. Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Hoffmann, H. und Dehmel, H., Über die Prüfung von Desinfektionsmitteln mit der Deckglasmethode nach Jensen. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 134. 1935. S. 182—186.)

Die Deckglasmethode nach Jensen hat den Vorteil, daß nur ein Faktor — die Konzentration des Desinfektionsmittels — zu variieren ist, während die Einwirkungszeit stets die gleiche bleibt. Die Technik ist einfach und zuverlässig.

Man verfährt im Prinzip in folgender Weise: Sterile Deckgläschen werden mit je 1 Öse Agarabschwemmung einer 24 stündigen Kultur von Staphylococcus pyog. aureus beschickt. Nach dem Trocknen werden die Deckgläschen je 2 Min. in verschiedene Phenollösungen gelegt, in sterilem Aqua dest. abgespült und in Röhrchen mit optimaler Nährflussigkeit übertragen. In gleicher Weise und unter Verwendung derselben Konzentrationen wie bei Phenol wird der Versuch mit dem zu prüfenden Desinfektionsmittel durchgeführt. Nach 48 stündiger Bebrütung der Bouillonröhrchen mit den vorbehandelten Deckgläschen wird das Ergebnis abgelesen und der Phenolkoeffizient errechnet (stärkste Verdünnung des Desinfektionsmittels, die in 2 Min. alle Keime abtötete, dividiert durch die Zahl der stärksten Verdünnung von Phenol, die ebenfalls in 2 Min. alle Keime abtötete).

Die Bestimmung des Phenolkoeffizienten nur gegenüber Staph. pyog. aureus ist ausreichend, um den Wirkungswert eines Desinfektionsmittels bei vegetativen Bakterienformen zu ermitteln, da dieser Keim einer der widerstandsfähigsten sporenlosen Keime ist.

Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Kaplan, M., Über das Vorgehen bei Mischung von Körperflüssigkeiten (Ascites, Serum, Blut) mit Nähragar. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 134. 1935. S. 398—400.)

Um rasch eine gleichmäßige Mischung zu erreichen, wird folgendes Vorgehen empfohlen: Während die Röhrchen mit dem verflüssigten Agar auf 58—60° abgekühlt werden, wird die zur Mischung jeweils erforderliche Menge Körperflüssigkeit in sterile „Mischungsröhrchen" (mit 14 mm Lichtweite) eingefüllt, die zweckmäßig in einem Gestell unter einem Winkel von 45° stehen. Der abgekühlte Agar wird dann rasch in das Mischungsröhrchen eingekippt (unter Vermeidung von Luftblasen) und die Mischung anschließend in die Petrischale gegossen. Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Konrich, F., Vorkommen und Resistenz hochresistenter Erdsporen mit besonderer Berücksichtigung der Instrumentensterilisation. (Arbeiten a. d. Reichsgesundheitsamte. Bd. 68. 1935. S. 81—88.)

Die hochresistenten Bakteriensporen sind in der Erde verschiedener Herkunft ungleichmäßig verteilt, sie werden darin verhältnismäßig nicht sehr häufig angetroffen. Für Sterilisierversuche ergibt sich hieraus die Forderung, nicht irgendeine Erde zu benutzen, auch wenn sie aus gedüngtem Boden stammt, sondern nur solche Erde, die nachweislich solche Formen enthält. Außerdem dürfen die jeweils ausgesäten Erdmengen nicht zu klein gewählt werden (nicht unter 0,5 g).

Dampf von 110° (½ atü) tötet die Sporen in längstens 2 Std., solcher von 120° (1 atü) in längstens 7 Min. Die mikrobiologische Grundlage der genormten Sterilisation (bei 120°) ist dadurch erneut als brauchbar erwiesen.

Es gelingt aber nicht, durch frei siedende 2proz. Sodalösung innerhalb praktisch verwendbarer Zeiten Erdsporen stets abzutöten.

Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Lihnell, D., Zur Frage der chemischen Sterilisierung von Humus für Pilzkulturen. (Archiv f. Mikrobiologie. Bd. 6. 1935. S. 326—333.)

Da viele Bodenpilze, namentlich Hymenomyceten auf hitzesterilisiertem Boden nicht wachsen, überprüfte Verf. die Angaben von Schweitzer über die gute Sterilisationswirkung von Formalin, Chloroform, Äthylalkohol und Toluol. Es konnte lediglich eine partielle Sterilisation erzielt werden; am stärksten wirkte Äthylalkohol, der alle Pilzsporen abtötete und den Bakteriengehalt auf 2% herabsetzte. Doch wurden auf dem behandelten Humus empfindliche Formen, wie Boletus-Arten in ihrem Wachstum völlig gehemmt; die Methode Schweitzer kommt also für eine vollständige Sterilisation nicht in Frage. Rippel (Göttingen).

Mündel, O., Bemerkungen zur Arbeit „Über die Sterilisationsleistung bewegter Heißluft“ von Breinl und Hofmann in dieser Zeitschrift, Bd. 113. H. 6. 1935. (Arch. f. Hyg. u. Bakt. Bd. 114. 1935. S. 311—312.)

Die von Breinl und Hofmann empfohlene Anwendung niedriger Temperaturen (100—120°) in Verbindung mit hoher Windgeschwindigkeit hält Verf. für unzureichend zur Sterilisation. Es werden möglichst hohe Temperaturen (180°) empfohlen, da dadurch die Sterilisationsdauer abgekürzt wird und das Sterilisationsgut weniger leidet als bei Verwendung niedriger Temperaturen für längere Zeit.

Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Abshagen, H.-G., Schutzglocke zum Bunsenbrenner, ein Hilfsgerät für das bakteriologische Arbeiten. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 134. 1935. S. 489—490.)

Das Arbeiten mit Reinkulturen von Sporenbildnern und säurefesten Bakterien ist deshalb besonders gefährlich, weil diese Bakterien beim Absprengen aus der Bunsenflamme zum Teil am Leben bleiben und somit den Arbeitsplatz infizieren können. Für diese Fälle und zur Verhütung des Verstreuens stark wuchernder apathogener Keime (Heubazillen, Schimmelpilze) empfiehlt sich die Verwendung einer gläsernen Schutzglocke (Hersteller: Fa. F. W. Kühner, Rostock), die mittels metallner Schraubenmuffe am Bunsenrohr befestigt wird. Aus Glas wird die Glocke hergestellt, um das Ausglühen der Öse mit dem Auge kontrollieren zu können. Verwendung findet „Suprax“-Glas von Schott, das schwerstschmelzbar ist und die starke Erhitzung auch bei stundenlangem Gebrauch des Gerätes ohne weiteres verträgt. Ein Herausspritzen infektiöser Bröckel kann praktisch nicht vorkommen, die verspritzten Teilchen werden von der Glocke aufgefangen und bei der hohen Temperatur des Glases binnen kurzem völlig verkohlt. Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

McCartney, J. E., Nährbodenbehälter mit Schraubkappenverschluß. (Ihre Anwendung für die aerobe und anaerobe Züchtung, sowie für die Blutkultur. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 134. 1935. S. 486—488.)

Es wird über eine neue Art von Nährbodengefäßen berichtet, die dem Prinzip der Konserve entsprechen. Der Nährboden wird in einem hermetisch

abgeschlossenen Behälter der Sterilisierung unterworfen, wodurch unbeschränkte Verwendbarkeitsdauer erzielt wird. Die Gefäße haben die Form von flachen Flaschen und sind am Flaschenhals mit einem Schraubengewinde versehen. Als Abschluß dient eine Aluminiumkappe, in die ein dünnes Plättchen von wachsgetränktem Papier eingelegt wird, das zur Vermeidung des Anklebens am Flaschenrand nochmals mit einem Stück glatten, schwarzemaillierten Papiers bedeckt ist. Zur Anaerobenzüchtung wird die Dichtungsscheibe aus wachsgetränktem Papier durch eine Gummischeibe ersetzt und an Stelle der soliden Schraubkappe eine in der Mitte durchbohrte (7 mm) Kappe verwendet. Die an der Stelle der Durchbohrung freiliegende Gummischeibe wird mit einer Punktionsnadel punktiert, durch die die Luft abgesaugt wird. Das derart erzielte Vakuum wird mit nur ganz geringen Verlusten für 24 Std. beibehalten und gestattet das Wachstum selbst sehr empfindlicher Anaerobier.

Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Morphologie, Physiologie und Systematik der Mikroorganismen; Virusuntersuchungen.

Pulkki, L. K., Studies on the production of bacterial growth stimulants by yeast. (Annales Academiae Scientiarum Fennicae. Ser. A. T. 41. No. 1. 141 p.)

Verf. hat die schon sehr häufig behandelte, aber noch keineswegs endgültig geklärte Frage der durch Hefen gebildeten Wuchsstoffe und ihre Wirkung auf das Wachstum der Bakterien mit besonderer Berücksichtigung des Einflusses verschiedener Ernährungsbedingungen erneut untersucht.

Bei der Prüfung des Einflusses der verschiedensten organischen und anorganischen Substanzen auf das Wachstum von Bac. mycoides, der ausschließlich als Versuchsmaterial diente, erwiesen sich Hefeasche, Ammonsulfat, Saccharose, Inosit, Mannit, Agar und eine Suspension von Mineralöl als unwirksam. Wachstumshemmend wirkte kristallinisches Vitamin C in einer Konzentration von 0,02%, während Thalliumnitrat das Wachstum von Bac. mycoides in einer Konzentration von 0,001% gänzlich sistierte. Dagegen konnten wachstumsfördernde Substanzen in Molken, Bierwürze und besonders in wässerigem Hefeextrakt nachgewiesen werden. Ein aus einer Bac. mycoides-Kultur erhaltener Extrakt war vollständig ohne Wirkung auf das Wachstum.

Sämtliche auf Wuchsstoff untersuchten Hefestämme zeigten die Fähigkeit, wachstumsfördernde Substanzen zu bilden, wobei sich jedoch quantitative Unterschiede in der Wuchsstoffbildung ergaben. Unterschiede zwischen obergäriger und untergäriger Hefe wurden nicht festgestellt. Ein direktes Verhältnis zwischen Intensität des Wachstums der Hefe und Wuchsstoffbildung konnte nicht beobachtet werden. Der in der Hefe enthaltene Wuchsstoff ist hitzeresistent. Luftzufuhr und Temperatureinfluß erhöhten wohl das Wachstum der Hefe, jedoch nicht die Wuchsstoffbildung. Ultraviolettes Licht war ebenfalls wirkungslos. Das p_H-Optimum für die Bildung wachstumsfördernder Stoffe liegt bei $p_H = 7{,}0$. Durch Zusatz kleiner Mengen Hefeextrakt zu einer synthetischen Nährlösung konnte eine Zunahme des Wuchsstoffgehaltes beobachtet werden, während in einer Peptonnährlösung weder durch große Impfmengen noch durch Zugabe von Hefeextrakt oder Bierwürze eine Erhöhung des Wuchsstoffgehaltes erzielt werden konnte. Die Wuchsstoffe verursachten eine beträchtliche Kürzung der Bakterienzellen.

Wurde Hefeextrakt zu einer für das Wachstum des Bac. mycoides optimalen Nährlösung zugegeben, so konnte die Bakterienzahl um das 4fache erhöht werden, die Länge der Zelle nahm dabei ungefähr um die Hälfte der normalen Größe ab; daraus schließt Verf., daß sich die Wirkung der Wuchsstoffe besonders auf die Beschleunigung der Zellteilung erstreckt. Die Wirksamkeit der Wuchsstoffe erwies sich als abhängig von der Nährlösung. So konnte in 100 ccm einer Peptonnährlösung durch Hinzufügen von 1 ccm Extraktlösung die Anzahl der Zellen ungefähr verdoppelt werden, während in einer mineralischen Glukosenährlösung durch Zugabe von geringsten Mengen des Extraktes die Bakterienzahl sogar auf das 15fache erhöht werden konnte. Bucksteeg (Berlin-Dahlem).

Kaeß, G. und **Schwartz, W.**, Über das Wachstum von Schimmelpilzen bei hoher relativer Luftfeuchtigkeit. (Archiv f. Mikrobiologie. Bd. 6. 1935. S. 208—214.)

Ziel der Versuche war, die genaue Lage des Wachstumsoptimums bei hoher relativer Luftfeuchtigkeit festzustellen. Verschiedene Luftfeuchtigkeit wurde durch verschiedene Konzentration der Nährlösung erzielt (100proz. relative Luftfeuchtigkeit würde die Nährstoffe in unendlicher Verdünnung enthalten). Die Versuche wurden auf zweierlei Weise ausgeführt: mit gleichen Mengen verschieden konzentrierter Nährlösung und mit verschiedenen Mengen von Nährlösung bei gleichen absoluten Nährstoffmengen.

Beide Methoden ergaben für den Versuchspilz Penicillium flavo-glaucum optimales Wachstum bei etwa 99,35% relativer Luftfeuchtigkeit, entsprechend einem osmotischen Druck in der Nährlösung von rund 8 Atm. Rippel (Göttingen).

Schopfer, W. H., Recherches sur l'utilisation des facteurs de croissance par un microorganisme. La synthese biologique des facteurs de croissance. (Archiv f. Mikrobiologie. Bd. 6. 1935. S. 196—207.)

Das auf Phycomyces blakesleeanus wirkende Vitamin B 1 wird von dem Pilz aufgenommen, so daß seine Wirkung nicht außerhalb der Zelle (etwa durch Aktivierung von Nährstoffen) liegen kann, sondern es innerhalb der Zelle zur Wirkung kommen muß. Das Substrat, dem Vitamin zugesetzt ist, verliert seine Wirkung nach Maßgabe des Fortschreitens der Entwicklung des Pilzes. Extrakt des auf vitaminhaltigem Nährboden gezogenen Myzels vermag auf vitaminfreie Kulturen zu wirken; aber der Extrakt ist weniger wirksam als direkter Zusatz von Vitamin B 1. Dieser Extrakt ist auch wirksam auf andere, auf Wachstumsfaktoren ansprechende Mucorineen (Dicranophora fulva), weiterhin auf Hefe. Auch die nicht auf Wachstumsfaktoren ansprechenden Mucorineen enthalten diese Faktoren.

Verf. kommt zu dem Schluß, daß Phycomyces auf Grund des Vitamins einen wachstumsfördernden Stoff bildet, dessen Natur nicht aufgeklärt ist. Es kann sich um Bildung des Vitamin B 1 selbst handeln oder um einen anderen Faktor. Außerdem muß die Bildung des hefefördernden Stoffes mit dem Vitamin B 1 zusammenhängen. Rippel (Göttingen).

Gerber, K., Beitrag zur Biologie der flechtenbewohnenden Pilze. (Archiv f. Mikrobiologie. Bd. 6. 1935. S. 182—195.)

Beschrieben werden 3 neue Funde: Tapesia lata n. spec. auf Chaenotheca arenaria, ein Fungus imperfectus auf Cladonia papillaria, ein epiphytischer Pilz auf Lecidea sudetica. Es kann sich nicht um reine Parasiten handeln, wie man bisher annahm, sondern es finden sich Hinweise auf die Entwicklung solcher „Parasiten" zu Symbionten. Daran knüpft der Verf. Betrachtungen über die phylogenetische Entstehung der Flechtensymbiose. Er unterscheidet 4 Entwicklungsstufen: 1. Oberflächlich verbreitetes Myzel. 2. Eindringen in das Substrat zu den Gonidien entweder durch kräftige Thallusbildung und Zerstörung des Flechtenpilzes, oder durch Eindringen des Sekundärpilzes ohne Zerstörung des Flechtenpilzes, oder durch Eindringen über mechanische Verletzungen. 3. Veränderung des eingedrungenen Sekundärpilzes in Richtung der Ausbildung schlankerer Zellen, die entweder rein parasitär werden für Alge und Flechtenpilz oder sich als Symbiont ohne Schädigung der Alge eingliedern, wobei die beiden Pilzsymbionten örtlich getrennt auftreten. 4. Ausbildung einer „Doppelflechte": Die beiden Pilze, Flechtenpilz und Sekundärpilz, umspinnen gemeinschaftlich die Gonidien.

Rippel (Göttingen).

van Niel, C. B., and Smith, J. H. C., Studies on the pigments of the purple bacteria. I. On spirilloxanthin, a component of the pigment complex of Spirillum rubrum. (Arch. f. Mikrobiolog. Vol. 6. 1935. p. 219—229.)

Verff. beschreiben zunächst die Gewinnung und Reinigung des in flachen, purpurnen Kristallen kristallisierenden Spirilloxanthins aus Spirillum rubrum, das in einer Menge von 0,028% der Bakterienmasse gewonnen werden konnte. Die Analyse ergab die Zusammensetzung $C_{48}H_{66}O_3$. Das Molekül enthält 15 Doppelbindungen. Nicht mehr als ein Sauerstoffatom ist in einer Hydroxyl-Gruppe vorhanden. Freie Carboxylgruppen sind nicht vorhanden. Das Absorptionsspektrum zeigt den auch durch katalytische Hydrierung gefundenen hohen Grad der Nicht-Sättigung.

Der Farbstoff ist ein Karotinoid. Es sind auch noch andere Karotine in dem Organismus vorhanden, die aber nicht in einer für die Analyse ausreichenden Menge isoliert werden konnten. Rippel (Göttingen).

McCoy, E., and McClung, L. S., Studies on anaerobic bacteria. VI. The nature and systematic position of a new chromogenic Clostridium. (Arch. f. Mikrobiol. Vol. 6. 1935. p. 230—238.)

Farbstoffbildung ist bei Anaeroben selten (der Referent möchte darauf hinweisen, daß die von den Verff. nicht erwähnten anaeroben Cellulosezersetzer schöne Farbstoffbildung zeigen; vgl. R. Meyer, Arch. f. Mikrobiol. Bd. 5, S. 185). Der neue Organismus Clostridium roseum nov. spec. ist charakterisiert durch einen rotorange Farbstoff, der bei Oxydation zu purpurn umschlägt. Er besitzt große Ähnlichkeit mit Cl. acetobutylicum bei der Vergärung von Mais-Maische, mit den neutralen Produkten Aceton, Aethylalkohol und Butylalkohol in fast gleichen Mengen. Er ist aber agglutinationsverschieden von diesem sowie von Cl. felsineum und einigen anderen physiologisch weniger verwandten anaeroben Buttersäurebildnern. Er verflüssigt Gelatine, reduziert Nitrate und vergärt verschiedene Kohlenhydrate einschließlich Pektin. Rippel (Göttingen).

Thornberry, H. H., Quantitative studies on the filtration of tobacco-mosaic virus. (Phytopath. Vol. 25. 1935. p. 601.)

Verf. filtrierte mit dest. Wasser verdünnte Suspensionen des Tabakmosaikvirus durch Berkefeld-W-Filter. Ein Vergleich der filtrierten und nicht filtrierten Suspensionen zeigte, daß sie in bezug auf Infektiosität einander um so näher kamen, je höher der Grad der Verdünnung war. Während bei der Verdünnung 2×10^{-1} die filtrierte Suspension nur 79% der Infektiosität der nicht filtrierten erreichte, war der Unterschied zwischen filtriert und nicht filtriert bei der höheren Verdünnung $0{,}2 \times 10^{-2}$ annähernd ausgeglichen.

Ausschlaggebend für das Filtrationsergebnis ist ferner die Wasserstoffionenkonzentration der Suspension. Bei p_H 8,5 passiert das Virus das Filter vollkommen ungehindert, bei p_H 1,5 dagegen überhaupt nicht mehr. Bei dazwischenliegenden p_H-Werten ist das Virus nur partiell filtrierbar. Im sauren Medium wird es zu Beginn der Filtration an das Filter adsorbiert. Das adsorbierte Virus läßt sich durch Phosphatpuffer bei p_H 8,5 leicht auswaschen, in 10 ccm Pufferlösung können etwa 80% des Virus wiedergewonnen werden. Die Größe der Viruspartikel wird auf 18—38 mμ geschätzt.

E. Köhler (Berlin-Dahlem).

Enzymologie und Bakteriophagie.

Gorbach, G. und Ulm, R., Zur Kenntnis der Bakterienproteasen. III. Mitteilung. Die Acidoproteolyten Gorinis. (Archiv f. Mikrobiologie. Bd. 6. 1935. S. 362—368.)

Es wurden die Proteasen von Mammococcus Gorini untersucht, die Kasein bei stark saurer Reaktion abbauen und von Gorini „Acidoproteolyten" genannt wurden. Es konnte eine Proteinase festgestellt werden, deren Wirkungsoptimum bei neutraler Reaktion liegt, und die durch Blausäure in ihrer Wirkung gesteigert wird. Es handelt sich demnach um ein Enzym vom Papain-Typus.

Der Abbau von Kasein und Gelatine laufen nicht parallel. Bei zunehmendem Alter der Bakterien oder der Enzymlösungen nimmt der Abbau von Kasein zu, von Gelatine und Witte-Pepton dagegen ab.

Es ist auch eine Peptidase vorhanden mit dem Wirkungsoptimum bei p_H 4,8; ihre Wirkung nimmt mit zunehmendem Alter von Bakterien und Enzymlösungen ab.

Rippel (Göttingen).

Bach, A., Ermol'jewa, Z. und Stepanian, N., Die Bindung des Luftstickstoffs durch die aus den Azotobaktern extrahierten Enzyme bei gewöhnlicher Temperatur und Druck. (Vorträge der Akademie der Wissenschaften U. d. S.S.R. Bd. 1. Nr. 1. 1934. S. 22—24.) [Russ.]

Der aus dem Az. chroococcum nach seinem Verreiben mit Sand bei Vorhandensein von Mannit bzw. von Glukose gewonnene Auszug enthielt sehr bedeutende Mengen von NH_3. Verf. erklärt dies durch die Wirkung der Fermente des Azotobakters, die den Luftstickstoff binden, indem sie ihn in NH_3 überführen.

M. Gordienko (Berlin-Schöneberg).

Scalfi, A., A propos de l'épuration du bactériophage par la cataphorèse. (Soc. Intern. di Microbiol. Boll. della Sez. Ital. Vol. 7. 1935. p. 159—163.)

Zur Vermeidung des Eiweißkollaps bei Verimpfung von Bakteriophagen und zur Beantwortung der Frage, ob den Beimischungen von Bakterieneiweiß oder den Bakteriophagen selbst die erzielten Heilerfolge zuzuschreiben sind, wurde es notwendig, die Bakteriophagen-Präparate zu reinigen. Von den verschiedenen diesbezüglichen Methoden lehnt Verf. die chemischen als unzulänglich oder zu umständlich ab und gelangt mit dem Reinigungsverfahren durch Kataphorese nach Marnier und Grizer zu beachtlichen Erfolgen. Mit dem auf solche Weise gereinigten lytischen Prinzip, das an seiner Wirksamkeit kaum Einbuße erleidet, fallen alle Eiweißreaktionen negativ aus. Es konnte außerdem ermittelt werden, daß die elektrische Ladung der Bakteriophagenteilchen unabhängig ist von derjenigen der der Lyse unterworfenen Bakterien. Bortels (Berlin-Dahlem).

Hoder, F. und Akano, R., Untersuchungen über „Bakteriophagenträger" (lysinogene Stämme) bei verschiedenen Bakterien. (Ztschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therapie. Bd. 85. 1935. S. 423—432.)

Die Untersuchung von 25 E-Ruhrstämmen ergab das Vorhandensein von 5 (20%) Bakteriophagenträgern. Dies sind Stämme, die bakteriophagenhaltig sind und bei ihrer Vermehrung stets Bakteriophagen erzeugen, ohne dabei selbst irgendwelche Wachstums- oder sonstige Störungen und ohne irgendeine äußere Wirkung der in ihnen enthaltenen Bakteriophagen zu zeigen. Die Wirkung der isolierten Phagen war spezifisch. Unter 40 aus menschlichen Krankheitsprodukten gezüchteten Staph. pyog. aureus-Stämmen fanden sich 5 (12,5%) Bakteriophagenträger. Diese Phagen wirkten außer auf pathogene Staphylokokken auch auf einige saprophytische Kokkenstämme aus Luft und Erdboden. Von 40 Bodenbakterien erwiesen sich 2 (5%) anhämolytische Kokkenstämme als Bakteriophagenträger. Die von ihnen erzeugten Phagen beeinflußten lediglich Staph. aureus-Stämme menschlichen Ursprunges, nicht aber Luft- und Bodenkokken. Unter 95 Luftbakterien fand sich kein Bakteriophagenträger.

Da die beiden als Bakteriophagenträger festgestellten Bodenbakterien aus einem Hofe stammten, in dem Hühner gehalten wurden, erscheint es nicht ausgeschlossen, daß es sich bei diesen Bakteriophagenträgern um veränderte Staph. aureus-Stämme bzw. Stämme menschlicher oder tierischer Herkunft gehandelt hat. Ob das verhältnismäßig häufige Auftreten von Bakteriophagenträgern bei den Bakterien menschlichen Ursprunges auf den Kontakt dieser Keime mit dem menschlichen oder tierischen Körper zurückzuführen ist, ist noch nicht geklärt.

Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Mikrobiologie der Nahrungs-, Genuß- und Futtermittel.

Thurston, L. M., and Olson, H. C., The bacterial flora of high-grade milk before and after pasteurization. Part I. Percentage reduction of bacterial count by pasteurization and proportions of physiologic and morphologic types present. Part II. Changes in standard count, acidity, flavor, and physiologic types of bacteria due to storage at various temperatures. (Virg. Agr. Exp. Sta. Bull. 255. 1933.)

Zu I. Die prozentuale Keimabtötung auf Grund der Dauerpasteurisierung war um so stärker, je höher die Ausgangskeimzahlen der Rohmilch

waren: Unter 5000 pro Kubikzentimeter konnte nur eine Pasteurisierwirkung von 75,4%, über 60 000 jedoch eine solche von 99,4% verzeichnet werden. Dabei hielten sich aber die absoluten Überlebenszahlen ziemlich konstant auf derselben Höhe und waren mehr oder weniger unabhängig von der Ausgangskeimzahl. Es zeigte sich des weiteren, daß die Schwankungen in der Pasteurisierwirkung bei den keimarmen Milchen viel größer waren als bei den keimreichen. — Was die prozentische Verteilung der physiologischen Bakteriengruppen vor und nach Pasteurisierung betrifft, so war am auffallendsten die Verschiebung innerhalb der Säurebildnergruppe. Die Verhältniszahl der schwachen Säurebildner stieg nach Pasteurisierung von rund 18,3% auf 48,0%, während die starken (koagulierenden) Säurebildner von 52,2% auf 19,6% zurückgingen. Das Verhältnis der indifferenten und proteolytischen Formen erfuhr auf Grund der Pasteurisierung keine wesentlichen Veränderungen. Durch die nachfolgende Infektion beim Passieren der Leitungen, Kühler, Abfüllmaschinen erfuhren in der auf Flaschen abgefüllten Milch die Verhältniszahlen der schwachen und starken Säurebildner sowie der Eiweißzersetzer eine Erhöhung. Was die Verteilung der Typen nach rein morphologischen Gesichtspunkten betrifft, so zeigte sich nach Pasteurisierung keine Änderung bezüglich der Mikrokokken, dagegen ein ausgesprochenes Ansteigen der Stäbchenformen und ein entsprechendes Abnehmen der Streptokokken. Die Stäbchenformen waren in der Hauptsache nichtkoagulierende Säurebildner, während die Streptokokken weitgehend solche waren, die die Milch koagulierten.

Zu II. Es wurde eine eingehende Untersuchung darüber angestellt, wie sich die verschiedenen Bakteriengruppen in Rohmilch und in pasteurisierter, auf Flaschen gefüllter Milch bei verschiedenen Aufbewahrungstemperaturen (variierend von 2,2—13,2° C) während 4 Tagen untereinander verhielten. Die durch sehr instruktive graphische Darstellungen erläuterten Ergebnisse zeigten deutlich, daß in pasteurisierter Qualitätsmilch bei den angegebenen Temperaturen kaum eine Gefahr besteht, daß die Eiweißzersetzer die anderen Bakterientypen überwuchern. Im übrigen hatte unter den angegebenen Versuchsbedingungen die in Flaschen abgefüllte Milch bereits nach 2 Tagen einen pappeähnlichen Geschmack und Geruch angenommen. K. J. Demeter (München-Weihenstephan).

Stone, R. V., and Bogen, E., Studies of correlated human and bovine brucelliasis. (Amer. Journ. Publ. Health. Vol. 25. 1935. p. 580—588.)

Der Genuß von Rohmilch, die von mit Bang-Bazillen infizierten Kühen stammt, ist für die Entstehung von Abortus-Agglutininen im Blut gewisser Konsumenten verantwortlich zu machen. Ungefähr 8% von allen Personen, die ständig stark mit Bang-Bazillen verseuchte Milch genossen hatten, reagierten positiv auf Abortus-Agglutinin. Bevorzugung von Geschlecht oder Alter in bezug auf Empfänglichkeit gegenüber Abortus konnte nicht beobachtet werden, auch fanden sich keine Beziehungen zu Tuberkulose. Bei mehr als der Hälfte der Patienten, die Agglutinin-positiv waren, zeigte sich keinerlei klinische Erscheinung, und nur der 11. Teil der Infizierten ließ Erscheinungen erkennen, die eine Diagnose auf Wechselfieber zuließen. Ein weiterer Prozentsatz wies andere Symptome auf, die möglicherweise ebenfalls auf die Abortus-Infektion zurückgeführt werden könnten. Bei den klini-

schen Fällen traten aber die Krankheitserscheinungen in verhältnismäßig milder Form auf und keineswegs in der Weise, wie man es bei den Infektionen mit Stämmen aus Ziege und Schwein gewohnt ist. Immerhin muß beachtet werden, daß das Krankheitsbild auf Grund der Infektion mit verschiedenen Brucella-Rassen im Prinzip ein sehr einheitliches ist.

K. J. Demeter (München-Weihenstephan).

Demeter, K. J., Über die zweckmäßigste Bebrütungs-Zeit und -Temperatur bei der bakteriologischen Vorzugsmilch-Kontrolle. Sonderdruck (als Manuskript gedruckt 1933; Verl. Kurz & Co., Kempten). 6 S.

Verf. setzt sich eingangs mit der von ihm als unmöglich bezeichneten Bebrütung von Vorzugsmilch-Agarplatten während nur 24 Std. bei 37° C kritisch auseinander, und zwar auf Grund der Tatsache, daß 1. die Zeit für das Auswachsen sämtlicher vorhandener lebender Keime zu kurz ist, 2. daß gewisse Schädlinge, deren zahlenmäßige Erfassung sehr wichtig ist (Fluoreszenten, Alkalibildner u. a.), bei dieser hohen Temperatur nur schlecht oder überhaupt nicht angehen und somit dem Nachweis entzogen bleiben, 3. daß bei dieser kurzen Bebrütungszeit viele Kolonien noch so klein sind, daß sie kaum mit der Lupe, geschweige denn mit freiem Auge gesehen werden können, wodurch eine genauere Zählung ungemein erschwert wird. Zum Nachweis der Unbrauchbarkeit dieses Verfahrens wurden vom Verf. eigene vergleichende Untersuchungen mit verschiedenen Bebrütungszeiten und -temperaturen durchgeführt. Dabei erwies es sich als besonders interessant, daß die nur 1tägige Bebrütung bei 30° C die 1tägige Bebrütung bei 37° C um das reichlich Dreifache übertraf! 2 Tage bei 30° C (diese Art Bebrütung ist inzwischen in Deutschland als Standard vorgesehen. Der Ref.) bewirkten im Vergleich zum offiziellen Verfahren eine Förderung um das mehr als Vierfache, im Vergleich zu der in Amerika üblichen Bebrütungsweise (2 Tage bei 37°) um das Dreifache. Ein weiterer Tag bei 30° C brachte im Vergleich zu der nur 2tägigen Bebrütung eine zusätzliche Erhöhung um 9%, worauf man aber im Interesse einer rasch durchführbaren Prüfung verzichten kann. (Dieses Verfahren [2 Tage bei 30° C] ist nun auch in die Richtlinien für die Prüfung von Milcherhitzungs-Apparaten auf Grund des Reichsmilchgesetzes aufgenommen worden; vgl. auch die folgenden Referate. Der Ref.)

Autorreferat.

Frazier, W. C., Johnson, W. T. jr., Evans, F. R., and Ramsdell, G. A., The bacteriology of swiss cheese. III. The relation of acidity of starters and of p_H of the interior of swiss cheeses to quality of cheese. (Journ. of Dairy Science. Vol. 18. 1935. p. 503—510.)

Für den Käser ist es von ausschlaggebender Bedeutung, zu wissen, 1. wie ein Säurewecker hergestellt werden muß, um möglichst wirksam zu sein und 2. wieviel von diesem genommen werden muß, damit die Milchsäuregärung den gewünschten Verlauf nimmt. Die zur Klärung dieser Frage durchgeführten Versuche wurden unter praktischen Bedingungen und mit Säureweckern bzw. Reinkulturen folgender Bakterien angestellt: Strept. thermophilus, Lactob. helveticus und Propionibact. Shermanii. Die Versuchsmilch besaß durchweg eine lange Entfärbungszeit in der Methylenblauprobe, hatte im Kessel eine aktuelle Azidität von 6,5—6,6 p_H und eine Titrationsazidität von 0,17%, der Fettgehalt wurde auf 3,5—3,8% eingestellt (Originalfettgehalt 4,3—4,9%). Als Maßstab für den Fortschritt der Milchsäuregärung durch die verschiedenen Säureweckerbakterien wurde die im Innern der Käse festgestellte p_H-Zahl betrachtet. Die Ergebnisse waren folgende: 1. Säurewecker mit Lactobac. helveticus waren am wirksamsten, wenn die Azi-

dität 1,0—1,09% betrug (Bebrütung 12 Std. lang bei 37,5—39° C). Säurewecker mit Strept. thermophilus sollen, wenn mit Milch angesetzt, eine Azidität von 0,70—0,75% besitzen, was durch eine Bebrütung von 12 Std. bei 37° erreicht wird. Bei Verwendung von Molke soll jedoch die Azidität nur 0,30—0,33% betragen. 2. In der Presse soll der Käse nach 3 Std. im Inneren eine p_H-Zahl von 6,0—6,09 aufweisen und nach 21 Std. eine solche von weniger als 5,2, am besten 5,0—5,15, natürlich unter der Voraussetzung, daß die Milch eine Ausgangs-p_H-Zahl von 6,5—6,6 hatte. 3. Wenn die Säurezunahme während der ersten 21 Std. etwas langsamer vonstatten ging, als eben angegeben wurde, ergab sich auch immer ein guter Käse, sofern die Ausgangsmilch von guter Qualität war (aktuelle Azidität nach 3 Std. p_H 6,1—6,25 und nach 21 Std. noch hoher als p_H 5,2).

K. J. Demeter (München-Weihenstephan).

Schnegg, H., und Kipphahn, H., Die Haltbarmachung von Bier mit dem Plattenkurzerhitzer „Astra" der Bergedorfer Eisenwerk A.-G. (Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen. Bd. 58. 1935. S. 41—46.)

Die Keimfreimachung von Restbier, teilweise auch von geschmacklich noch einwandfreiem Rückbier hat heute schon in zahlreichen Großbetrieben Eingang gefunden. Mit der Sterilisation des Ausstoßbieres ist man noch zurückhaltender, namentlich wenn es sich dabei um Erwärmung handelt, weil man Beeinträchtigungen des Bieres hinsichtlich Geschmack und Aussehen befürchtet.

In der Milchindustrie ist nun ein Verfahren der „Kurzzeiterhitzung" bekannt, bei dem die Flüssigkeit im Durchfluß erhitzt wird, und zwar in dünner Schicht, um die Durchwärmung der ganzen Flüssigkeitsschicht zu beschleunigen und so die Gesamterhitzungszeit abzukürzen. Bei der üblichen Bierpasteurisierung dauert der Prozeß einschließlich Anwärmen und Abkühlen etwa 2½ Std., wovon 30—45 Min. auf die eigentliche Pasteurisierung entfallen, bei einem Milchplattenpasteur, der für Brauereizwecke mit einer erhöhten Druckfestigkeit ausgerüstet und für eine Stundenleistung von 13 hl berechnet war, dauerte der ganze Sterilisierungsvorgang nur 2¼ Min., davon trafen auf die eigentliche Pasteurisierung nur 70 Sek. Man hat also zwei Vorteile: Verminderung der Erhitzungsdauer und Vermeidung jeder Überhitzung, wie sie beim normalen Pasteurisieren in der Flasche oder im Faß für die äußeren Flüssigkeitszonen nicht zu umgehen war, wenn man mit der Keimtötungstemperatur auch in die innersten Flüssigkeitsschichten vordringen wollte.

Bei insgesamt 24 Versuchen, bei denen mit Temperaturen von 55—75° C gearbeitet wurde, ergab sich, daß der Apparat bei Erhitzung auf 65° C in allen Fällen, auch bei schweren Infektionen, steriles Bier lieferte. Bei diesen Versuchen hatte man die Biere planmäßig mit Biersarzinen, Milchsäure- und Essigbakterien und wilden Hefen infiziert. Normale, gute Biere, bei denen keine nennenswerten Infektionen vorlagen, wurden ohne Ausnahme schon bei 62° C steril. Die sterilen Biere waren alle ohne Ausnahme nach mindestens sechsmonatlicher Lagerung bei 27° C noch völlig blank, hatten meist keinen oder nur einen sehr unbedeutenden Bodensatz von Eiweiß und enthielten keinerlei Keime. Der Apparat hat sich also für die Entkeimung von Ausstoßbier gut bewährt, ohne die sonstigen normalen Eigenschaften des Bieres (Geschmack, Kohlensäuregehalt, Schaumhaltigkeit) merkbar zu verändern.

Heuß (Berlin).

Bossart, A., Filtermassesterilisation. (Schweizer Brauerei-Rundschau. Bd. 46. 1935. S. 1—5.)

Die Sterilisation von Filtermasse im Kessel mit Wassertemperaturen von 86° C ist bei ½—1 stündiger Dauer ausreichend. Waschen mit kaltem Wasser ist völlig unzureichend, man fand auch bei einer Wassertemperatur von 50° C von ausgesprochenen Bierschädlingen neben anderen Organismen noch Sarzinen und Stäbchenbakterien (Saccharobacillus Pastorianus). Je höher die Temperatur steigt, desto geringer wird der Organismengehalt, doch findet man Wachstum auch noch bei 60, 70 und 80° C. Die reine Masse wird dann aber durch das bei der Abkühlung eingeleitete Kaltwasser, durch den Zutritt von Luft, ferner auf dem Transport durch die Leitung zur Presse, aus dieser selbst und aus den Filterschalen wieder mehr oder weniger stark infiziert, was zur Infektion des durchgehenden Bieres Veranlassung geben kann. Vorteilhafter ist die Sterilisation der Filtermasse im Rahmen nach vorangegangener Waschung bei 50° C durch umlaufendes Wasser, dessen Temperatur allmählich auf 86° C gesteigert und 30—40 Min. lang gehalten wird. Dabei ist eine nachträgliche Infektion so gut wie ausgeschlossen. Selbst nach 2 tägigem Stehen im Rahmen nach der Abkühlung waren sowohl Filtermasse als auch das Wasser absolut steril. Heuß (Berlin).

Mikrobiologie des Düngers, Bodens, Wassers und Abwassers.

Andrews, W. B., Carbon dioxide production by mannite-treated soils as a means of determining crop response to fertilizers. (Soil Science. Vol. 39. 1935. p. 47—57.)

Hier ist der Versuch unternommen worden, an Hand der CO_2-Produktion des Bodens Rückschlüsse auf dessen Düngungsbedürfnis zu ziehen. Verf. sammelte von 13 verschiedenen Feldern Mississippis und Louisianas Bodenproben, machte diese lufttrocken und gab zu je 100 g einmal 500 mg Mannit, in einer zweiten Reihe 500 mg Mannit + 30 mg $NaNO_3$ und in einer dritten Reihe Mannit + $NaNO_3$ + 25 mg Superphosphat. Sodann wurde die nach 24 Std. von den Mikroorganismen des Bodens entwickelte CO_2 bestimmt. In 10 von 13 Fällen stand die durch den Zusatz von N + P hervorgerufene Erhöhung der CO_2-Produktion in Übereinstimmung mit den Feldversuchen, d. h. auch im Feldversuch hatte der Zusatz von N + P die Erträge — es handelte sich um Baumwolle — erhöht. In 9 von 13 Fällen stand auch die Erhöhung der CO_2-Produktion durch Zugabe von N in Einklang mit der Erhöhung der Erträge. Nur in 2 Fällen wurden einander entgegengerichtete Ergebnisse erzielt. Merkwürdigerweise waren die positiven Beziehungen zwischen CO_2-Produktion und Ertrag nur bei den im Juli genommenen Bodenproben zu beobachten, nicht dagegen bei den im November genommenen. Es stellte sich heraus, daß das Trocknen des Bodens im November die Aktivität der Mikroorganismen stark zu verändern scheint. Immerhin glaubt der Verf., diese Methode zur Bestimmung des Düngungsbedürfnisses des Bodens in Vorschlag bringen zu können, da sie kurz und billig sei. Engel (Berlin).

du Toit, M. S., and Perold, I. S., The factors which influence the use of the conductivity of soil suspensions as a measure of fertility. (Soil Science. Vol. 39. 1935. p. 59—74.)

Gelegentlich von Untersuchungen über Faktoren, welche die elektrische Leitfähigkeit von Bodensuspensionen beeinflussen, konnte neben der hydrolytischen Wirkung des Wassers auch ein Einfluß der Boden-Mikroflora fest-

gestellt werden. In den ersten Tagen nach Vermischung des Bodens mit dem Leitfähigkeitswasser steigt die Leitfähigkeit an infolge der CO_2-Ausscheidung aerober Mikroorganismen. Sobald jedoch der Sauerstoff in den Suspensionen erschöpft ist, erfolgt kein Anstieg mehr. Zum Vergleich diente der nämliche, aber vorher sterilisierte Boden. Engel (Berlin).

Snow, L. M., A comparative study of the bacterial flora of wind-blown soil. IV. Shakleford bank, North Carolina. (Soil Science. Vol. 39. 1935. p. 227—231.)

Bereits in einigen weiter zurückliegenden Arbeiten untersuchte Verf. eine Reihe von Flugsandböden in U.S.A., so in der vorletzten Arbeit (Soil Science. Vol. 24. 1927) die Dünen an der Küste des Atlantik bei Sandwich, Massachusetts. Zum Vergleich wurde jetzt der Boden weiter südlich an der Küste des Atlantischen Ozeans in Nordkarolina auf seinen Bestand an Mikroorganismen geprüft. Es wurde in den Sanden bestimmt: Korngröße, Wasserkapazität, Wassergehalt, Gehalt an Karbonaten, Sulfaten, Chloriden und Nitraten, H-Ionenkonzentration, Gehalt an Bakterien (+ Hefen), Aktinomyceten und Pilzen. Innerhalb der Bakterien wurde unterschieden nach Farbe der Kolonien, nach Kokken, Pleomorphen, sporen- und nichtsporenbildenden Stäbchen, Grampositiven und -negativen, nach Gelatine- und Kasein-Verflüssigern, Glukose-, Saccharose- und Laktosevergärern usw. Die Sande waren naturgemäß, was die absoluten Mengen anbetrifft, arm an Mikroorganismen. Der Gesamtgehalt war bei den mehr sauren und gröberen Böden des Nordens größer, der relative Gehalt an Bakterien dagegen geringer als bei den mehr alkalischen und feineren Sanden der Carolinaküste. Im Norden enthielt der Boden dafür relativ mehr Pilze und Aktinomyceten. Auffallend war auch das fast völlige Fehlen von Sporenbildnern bei den Böden von Nordkarolina. Was die Kasein-Verflüssigung und Nitratzersetzung anbelangt, waren diese Böden jedoch den aus Massachusetts stammenden erheblich überlegen. Engel (Berlin).

Snow, L. M., A comparative study of the bacterial flora of wind-blown soil. V. Monterey Peninsula, California. (Soil Science. Vol. 39. 1935. p. 233—236.)

Hier wird der Flugsandboden der pazifischen Küste in Californien mit den atlantischen Dünenböden verglichen. Als wesentliche Unterschiede waren zu verzeichnen: Ein auffallend hoher Anteil an Aktinomyceten am Gesamtgehalt an Mikroorganismen und ferner eine wesentlich größere fermentative Aktivität, insbesondere was die Laktosevergärung anbetraf, vielleicht aber nur hervorgerufen durch tierische und menschliche Verschmutzungen an dem betreffenden Probenahme-Ort. Im übrigen ähnelte der pazifische Sand mehr dem aus Massachusetts als dem aus Karolina.

Engel (Berlin).

Zeetti, P., Nouvelle méthode d'analyse bactériologique des eaux. (Soc. Intern. di Microbiol. Boll. della Sez. Ital. Vol. 7. 1935. p. 164—170.)

Die von Rasumow vorgeschlagene Methode der bakteriologischen Wasser-Analyse mit genauen methodischen Angaben von Dianowa und Woroschilowa (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 90. 1934. S. 398—411) besteht darin, daß das Wasser durch aus alten Filmen selbst hergestellte Filter filtriert wird. Die auf dem Filter niedergeschlagenen Bak-

terien können nach Anfärben unmittelbar mikroskopisch gezählt werden, weil das Filter durch Aufbringen eines Tropfens Zedernöl oder Kanadabalsam durchsichtig wird. Oder aber das Filter wird auf einen festen Nährboden aufgelegt, wo sich dann die Keime zu Kolonien entwickeln. Verf. hat die Methode besonders auf die Zählung von Bact. coli angewandt und nach Übertragung der Filter auf Endo-Agar die Kolonien gezählt. Auf Grund eines Vergleiches der auf diese Weise und nach den üblichen älteren Methoden erzielten Ergebnisse muß das geschilderte Verfahren als sehr empfindlich und zugleich als einfach und schnell ausführbar bezeichnet werden.

Bortels (Berlin-Dahlem).

Schädigungen der Pflanzen durch Pilze, Bakterien und filtrierbare Vira.

Collins, E. J., The Problem of Immunity to Wart Disease (Synchytrium endobioticum [Schilb.] Perc.) in the Potato. (Ann. Bot. Vol. 49. 1935. p. 479—491.)

Das John Innes Horticultural Institute unternahm in den Jahren 1915—1927 Versuche über die Vererbung der Widerstandsfähigkeit verschiedener Kartoffelsorten gegen Phytophthora infestans. Bei dieser Gelegenheit wurden die Pflanzen auch auf Krebsfestigkeit geprüft. Die Anstellung der Untersuchungen wurde von 1918—1927 zu Ormskirk vorgenommen. Trat während zweier Beobachtungsjahre keine Infektion auf, so galt die Sorte als krebsfest. Es wurden gekreuzt: Immun mit immun, immune Inzucht untereinander, anfällige Inzucht untereinander, empfängliche Sorten mit anderen empfänglichen, immun mit anfällig usw. Verf. verglich seine Resultate mit den Tabellen von Lunden und Jorstad, Salaman und Lesley. Auf Grund seiner Zahlen, die innerhalb einer Versuchsreihe nicht einmal eine eindeutige Richtung erkennen lassen, schließt Verf., daß das Problem eher durch Vereinfachung zu lösen sei, als durch Neuaufstellung noch unbekannter und unberechenbarer Immunitätsfaktoren. Jede Kartoffelsorte verhält sich anders, so daß es unmöglich ist, ein allgemein gültiges Schema über die genetischen Verhältnisse aufzustellen.

Skallau (Berlin).

Dunegan, J. C., A phytophthora disease of peach seedlings. (Phytop. Vol. 25. 1935. p. 800—809, 2 figs.)

Verf. beschreibt eine durch Phytophthora cactorum an jungen Pfirsichbäumchen verursachte Erkrankung, die im Nordwesten von Arkansas beobachtet wurde. Der Pilz befällt die Sämlinge sobald sie aus der Erde herauskommen. Das Auftreten der Krankheit wird durch häufige Regenfälle und wolkiges Wetter zu Beginn der Vegetationszeit begünstigt. Die wichtigste Maßnahme zur Bekämpfung der Krankheit ist Anzucht der Sämlinge auf gut drainiertem Boden.

Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Schaal, L. A., Rhizoctonosis of potatoes grown under irrigation. (Phytop. Vol. 25. 1935. p. 748—762, 2 figs.)

Stengelinfektion mit Corticium vagum ist allgemein in dem Frühkartoffelgebiet in Colorado auf kaltem Boden verbreitet. Knolleninfektion spielt nur eine geringe Rolle. Bei Versuchen zeigte sich, daß die Stengelinfektion besonders dann auftrat, wenn die Frühkartoffeln früh in kalten Boden gepflanzt wurden. Übermäßige Feuchtigkeit und niedrige Bodentemperaturen haben starke Infektion der Knollen mit Sklerotien zur Folge. Starke Bewässerung spät in der Vegetationszeit erhöhte den Befall

der Knollen mit Sklerotien. Vorsichtige Bewässerung und Beizung der Knollen mit Sublimat sind die besten Bekämpfungsmaßnahmen. Die Beizung mit Sublimat erwies sich als besser als die mit Formaldehyd und organischen Quecksilberverbindungen. Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Wormald, H., The Brown Rot disease of fruit trees. (Ministry Agric. and Fish. Bull. 88. 1935. 50 S.)

Verf. gibt eine umfassende Darstellung der wirtschaftlich wichtigen Sclerotinia- bzw. Monilia-Arten unserer Obstbäume und der durch sie verursachten Schäden. Nach einem historischen Überblick wird die Nomenklatur behandelt. Danach ergeben sich folgende, jetzt gültige Namen: Sclerotinia fructigena Aderh. et Ruhl. für die europäische Form mit lederbraunen Monilia-Lagern; S. laxa Aderh. et Ruhl. (= S. cinerea) für die europäische Form mit grauen Monilia-Lagern; S. laxa Aderh. et Ruhl. f. mali (Worm.) Harr. für die an Apfel angepaßte biologische Form und S. fructicola (Wint.) Rehm (= S. americana) für den in Nordamerika weit verbreiteten Braunfäulepilz. Kurz erwähnt werden außerdem S. Cydoniae, S. Mespili und S. Crataegi. Es folgen Abschnitte über geographische Verbreitung, Morphologie, Physiologie, Infektionsbedingungen, sowie Angaben über Verluste, die durch Sclerotinia-Befall im Obstbau verursacht wurden. Endlich werden die verschiedenen Arten der Schädigung (Fruchtfäule, Blütenbräune, Knospensterben, Zweigsterben, Spitzendürre, Rindenbrand) nach Wirtspflanzen getrennt besprochen und die jeweils erforderlichen Bekämpfungsmaßnahmen angegeben. Den Schluß der inhaltreichen Arbeit bildet ein ausführliches Literaturverzeichnis. Hinsichtlich näherer Einzelheiten muß auf das Original verwiesen werden.

H. Richter (Berlin-Dahlem).

Nisikado, Y., and Yamauti, K., Contributions to the knowledge of saps stains of wood in Japan. III. Studies on Ceratostomella piceae Münch, the cause of a blue stain of pine tress. (Ber. d. Ohara Inst. f. landw. Forsch. Bd. 6. 1935. S. 539—560, 5 Taf.)

Ceratostomella piceae Münch wurde in Japan nicht nur an Pinus densiflora, P. parvifolia, P. Thunbergii, Picea Glehni, Picea jezoensis, sondern auch an Chamaecyparis obtusa, Ch. pisifera, Acer pictum, Betula japonica, Kalopanax ricinifolium, Prunus indica und Quercus glandifolia gefunden. Die Hyphen des Pilzes dringen auf die gleiche Weise wie die von Ceratostomella ips und C. pini ein. Der Pilz hat verhältnismäßig große lang geschnäbelte Perithezien. Die Askosporen sind nierenförmig. Der Pilz bildet 3 Typen von Konidien: Graphium, Cladosporium und Cephalosporium. Auf Nährboden war das Wachstum bei mittleren Temperaturen geringer als das von C. pini und C. ips. Ohne freien Sauerstoff fand weder eine Keimung noch ein Wachstum der Konidien statt. Konidien und Askosporen wurden durch Heißwasserbehandlung 10 Min. 52° C oder 15 Min. 50° C und durch 1 stünd. Tauchen in Sublimatlösung 1 : 4000 und Formalin- oder Uspulunlösung 1 : 200 abgetötet. Der Pilz wuchs auf Malzextrakt, dem Sublimat oder Uspulun 1 : 10 000 oder Kupfersulfat 1 : 5000 zugesetzt war. Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Abgeschlossen am 28. März 1936.

Zentralblatt für Bakt. etc. II. Abt. Bd. 94. No. 9/13.
Ausgegeben am 25. Mai 1936.

Wilhelm Henneberg †.

Von **Karl Heinz Meewes.**

Mit einem Bildnis.

Am 6. Januar d. J. noch versammelte sich die Kieler Forschungsanstalt für Milchwirtschaft zur Feier des 65. Geburtstages Prof. Dr. Hennebergs. Der Jubilar selbst mußte in letzter Minute sein Erscheinen wegen schwerer Erkrankung seiner Gattin, die schon am folgenden Tage verstarb, absagen. Am 11. Januar nahm er seinem 73. Doktoranden die Prüfung ab. Selbst schon seit einigen Tagen an einer Erkältung leidend, warf ihn eine Mandelentzündung aufs Krankenlager, von dem er sich nicht wieder erhob. Am 16. Januar schloß er die Augen für ewig.



Wilhelm Henneberg wurde am 6. Januar 1871 in Magdeburg geboren. Seine erste bakteriologische Arbeit, über Essigbakterien, fertigte er in den Jahren 1896/97 unter Zopfs Leitung an. Von 1897—1906 war er anfangs in der Essigabteilung des Instituts für Gärungsgewerbe tätig und darauf Assistent von Lindner. 1906 wurde er Leiter einer eigenen Abteilung. Als solcher beschäftigte er sich eingehend mit dem Studium der Hefezelle, ihrem Kern und ihrer richtigen Ernährung. Die Steigerung der Ausbeute in der heutigen Preßhefe-Industrie darf als Frucht seiner Forschungen angesehen werden. Durch Henneberg wurde die Reinkultur in die Gärungsessigbetriebe eingeführt, eine Tat, welche die Sicherheit auch dieser Betriebe in bezug auf Ausbeute und Qualität erhöhte. Schon in Berlin lieferte Henneberg grundlegende Arbeiten über Milchsäurebakterien. Er erkannte die Schädlichkeit gewisser „wilder Milchsäurebakterien“ für das Gärungsgewerbe und lehrte ihre Bekämpfung. 1903 veröffentlichte er eine umfangreiche Abhandlung über „Die

Milchsäurebakterien der Brennereimaische, der Milch, des Bieres, der Preßhefe, der Melasse, des Sauerkohls, der sauren Gurken, des Sauerteigs und des menschlichen Magens". Seine bis zum Tode bewahrte Vorliebe für die Zoologie fand ihren Niederschlag in Studien über die Biologie der Essigälchen und Essigfliegen, die große Anerkennung bei den Zoologen gefunden haben. Weitere Arbeiten in Berlin beschäftigten sich mit dem Volutin, den verschiedenen Futtereinsäuerungsarten, dem Sauerkraut, der Darmflora der Haustiere und Menschen und dem Nachweis der Zellulosebakterien. Wichtige Arbeit leistete er im Kriege über Futter- und Nährhefeherstellung mittels der Torula utilis, ferner über die Glyzeringewinnung sowie Acetonherstellung zur Bereitung von künstlichem Kautschuk.

Durch seine Berufung als Direktor des Bakteriologischen Institutes der Preußischen Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft und durch seine Ernennung zum Honorar-Professor der Christiana Albertina zu Kiel begann eine weitere große Epoche seines wissenschaftlichen Schaffens. Von seinen zahlreichen Veröffentlichungen ist sein „Handbuch der Gärungsbakteriologie", das in zwei Bänden die Ergebnisse seiner Forschungen bis 1926 zusammenstellt, als grundlegendes Werk der Gärungsbakteriologie zu nennen. Auf seine vielen späteren Arbeiten und die unter seiner Leitung angefertigten 80 Dissertationen soll hier nicht näher eingegangen werden. Neue wichtige bakteriologische Untersuchungsmethoden wurden von Henneberg eingeführt. Die von ihm angelegte mikrophotographische Sammlung von Hefen, Bakterien und Schimmelpilzen mit über 6000 Bildern dürfte ohne ihresgleichen in der Welt sein. In den letzten Jahren interessierte ihn am meisten das Studium der menschlichen Darmflora, insbesondere deren Umstellung durch den Genuß von Milcherzeugnissen, wie z. B. durch den von ihm in Deutschland eingeführten Reform-Yoghurt (Acidophilus-Milch), eine Arbeit, an der auch sein Sohn Anteil genommen hat und die dieser fortführen dürfte. Sein allzu früher Tod ließ manches Werk unvollendet, besonders eine Arbeit über Schimmelpilze, die ihn schon mehrere Jahre beschäftigte.

Über allem Spezialstudium verlor Henneberg nie die große Linie, die zu einer allgemeinen bakteriologischen Wissenschaft führte. Man darf ihn neben Lindner als den bedeutendsten Vorkämpfer für die Errichtung eines Zentralinstituts für bakteriologische Forschung, in dem sowohl die medizinische als auch die technische Bakteriologie als zusammengehörendes Ganzes ihre Pflege finden sollte, ansehen.

Ohne jemals Aufsehen von seiner eigenen Person zu machen, lebte Henneberg ein stilles Gelehrtendasein, stets ein Vorbild für seine Mitarbeiter, für seine vielen Schüler aus fast allen Ländern der Welt. Der bakteriologischen Fachwissenschaft wird er durch sein Werk, seinen engsten Mitarbeitern durch sein wahrhaft gütiges Menschentum unvergeßlich bleiben.

Zur Färbung des Myzels von Fusicladium dendriticum in Apfelblättern.

[Aus dem Botanischen Laboratorium der Prüfstelle für Pflanzenschutzmittel und Pflanzenschutzgeräte der Biologischen Reichsanstalt.]

Von **W. Holz.**

In einer früheren Mitteilung hatte ich eine Methodik beschrieben, die es ermöglicht, das Myzel von Fusicladium dendriticum in den Blättern sichtbar zu machen. Nach der Methode werden die Blätter nach dem Aufhellen in Kalilauge mit Essigsäure behandelt und nacheinander mit Gentianaviolett und Baumwollblau gefärbt. Bei weiteren Untersuchungen stellte sich heraus, daß die Färbung mit Baumwollblau allein erzielt werden kann. Der Gang der Untersuchungsmethode ist folgender:

Nachdem die Blätter in 20 proz. Kalilauge aufgehellt sind, werden sie 5—10 Min. lang in 96 proz. Essigsäure gebracht, kurz mit Leitungswasser ausgewaschen und dann mit Baumwollblau (Stammlösung nach Gage: 50 g Phenol, 50 g Milchsäure, 50 g Glyzerin, 1 g Baumwollblau von Grübler und 100 g Aqua dest. Gebrauchslösung: 1 Teil Stammlösung auf 9 Teile Wasser) gefärbt. Darauf wird das Blatt so lange in Leitungswasser ausgespült, bis die Blattnervatur himmelblau erscheint. Bei starkem Fusicladiumbefall ist die Rotfärbung des Myzels schon makroskopisch zu erkennen. Zur genaueren Untersuchung und bei schwachem Befall ist mikroskopische Beobachtung erforderlich. Besonders deutlich wird die Färbung bei künstlicher Beleuchtung.

Für die unterschiedliche Färbung der Blattnervatur und des Pilzmyzels ist die Tatsache von Bedeutung, daß Baumwollblau in alkalischer Lösung von Blau nach Rotviolett umschlägt. Das Pilzmyzel speichert anscheinend die Kalilauge stärker als die Blattnervatur und gibt sie auch durch die vorgeschriebene Behandlung mit Essigsäure nicht wieder ab.

Literaturverzeichnis.

Gage, G. R., Studies of the life history of Ustilago avenae (Pers.) Jens. and of Ustilago levis (Kell. and Swing). (Magn. Cornell Univ. Agr. Exp. Sta. Memoir. Vol. 109. 1927. p. 1—35.) — Holz, W., Eine Methode zur Feststellung des Befalls mit Fusicladium dendriticum vor dem Ausbruch der Schorfkrankheit bei Pirus malus. (Zentralbl. f. Bakt. Bd. 92. 1935. S. 459—461.)

Beiträge zur Biologie und Bekämpfung des Apfelschorfes (Fusicladium dendriticum [Wallr.] Fckl.). II.

[Aus dem Botanischen Laboratorium der Prüfstelle für Pflanzenschutzmittel und Pflanzenschutzgeräte der Biologischen Reichsanstalt, Berlin-Dahlem.]

Von **A. Winkelmann** und **W. Holz.**

Mit 8 Abbildungen im Text.

Auf Grund unserer Untersuchungen im Jahre 1934 waren wir zu der Überzeugung gekommen, daß die Bekämpfung des Apfelschorfes (Fusicladium dendriticum) durch Beobachtung des Erregers unter Berücksichtigung der für seine Entwicklung wichtigen klimatischen Bedingungen sicherer zu gestalten ist. Die Versuche im Jahre 1935 dienten zunächst einmal der Überprüfung unserer vorjährigen Ergebnisse. Weiter sollte durch Versuche unter konstanten Bedingungen im Gewächshaus und Laboratorium die Entwicklung von Fusicladium genauer beobachtet werden.

I. Die Entwicklung des Fusicladiums und seine Abhängigkeit von äußeren Faktoren.

1. Die Perithezien-Entwicklung im Freiland.

Die Beobachtung der Perithezien-Entwicklung im Freiland erfolgte in derselben Weise wie im vorigen Jahr. Am 1. Nov. 1934 wurden Apfelblätter der Sorten Kaiser Wilhelm, Baumanns Renette, Charlamowsky, Weißer Klarapfel, Goldparmäne, Boskoop und Landsberger Renette, die deutliche Fusicladium-Flecke zeigten, vom Baum gepflückt und in Blumentöpfe gepackt. Die Töpfe wurden im Obstgarten aufgestellt, so daß sie allen Witterungseinflüssen ausgesetzt waren. Um ein Herauswirbeln der Blätter zu verhindern, wurden die Töpfe mit Drahtgeflecht überdeckt.

Zur Untersuchung der Perithezien wurden in unregelmäßigen Zeitabständen während des Winters je 5 Blätter aller Sorten aus den Töpfen genommen, in 20proz. Kalilauge gekocht, bis sie hellbraun und durchsichtig wurden und dann bei etwa 100facher Vergrößerung die Perithezien untersucht. In Tabelle 1 ist der Durchmesser der jeweils größten Perithezien angegeben.

Tabelle 1. Größter Durchmesser der Perithezien in μ.

Sorte	3. 12. 34	10. 12. 34	8. 1. 35	24. 1. 35	1. 2. 35	13. 2. 35	21. 2. 35	1. 3. 35	11. 3. 35	12. 3. 35	18. 3. 35
Kaiser Wilhelm .	60	80	80	—	142	150	160	180	180	—	180
Baumanns Renette	75	90	90	157	160	195	203	225	232	232	248
Charlamowsky .	94	—	95	97	123	180	210	—	220	220	220
Weißer Klarapfel	97	97	97	142	147	150	163	165	180	186	195
Goldparmane . .	90	—	92	94	127	127	142	186	195	195	225
Boskoop	—	71	105	120	—	165	—	195	195	195	203
Landsb. Renette .	—	105	105	112	112	170	180	184	210	210	217

Aus der Tabelle geht hervor, daß bis Anfang Januar nur eine geringe Größenzunahme der Perithezien festzustellen war. Am 1. Febr. zeigten

die Perithezien bei den Sorten Kaiser Wilhelm, Weißer Klarapfel und Goldparmäne Borsten und auch bereits die ersten noch leeren Asci. Am 13. Febr. waren auf den Perithezienhälsen aller übrigen Sorten ebenfalls Borsten vorhanden.

Vom 1. Febr. 1935 ab wurden bei jeder Untersuchung die größten Perithezien herauspräpariert und zerquetscht, um festzustellen, wann die ersten Askosporen in den Schläuchen erscheinen. Am 21. Febr. waren in den Asci der Sorten Weißer Klarapfel und Baumanns Renette, am 1. März in denen der Landsberger Renette und denen von Boskoop die ersten gefärbten Askosporen zu sehen. Mitte März waren bei allen Sorten Askosporen festzustellen. Die Perithezien hatten eine schwarzbraune Färbung.

Tabelle 2. Prozentsatz der Askosporen, die beim Zerquetschen der Perithezien reif waren.

Sorte	21. 2.	1. 3.	11. 3.	12. 3.	18. 3.
Kaiser Wilhelm	0	0	2	—	10
Baumanns Renette	5	30	60	60	70
Charlamowsky	0	—	50	50	90
Weißer Klarapfel	2	2	5	5	10
Goldparmäne	0	0	30	30	70
Boskoop	—	40	60	60	70
Landsberger Renette	0	1	50	50	90

Ab 15. März wurden auf die Blätter zunächst weitmaschiger Draht und darauf mit Wollfett bestrichene Objektträger gelegt. Jeden 2. Tag

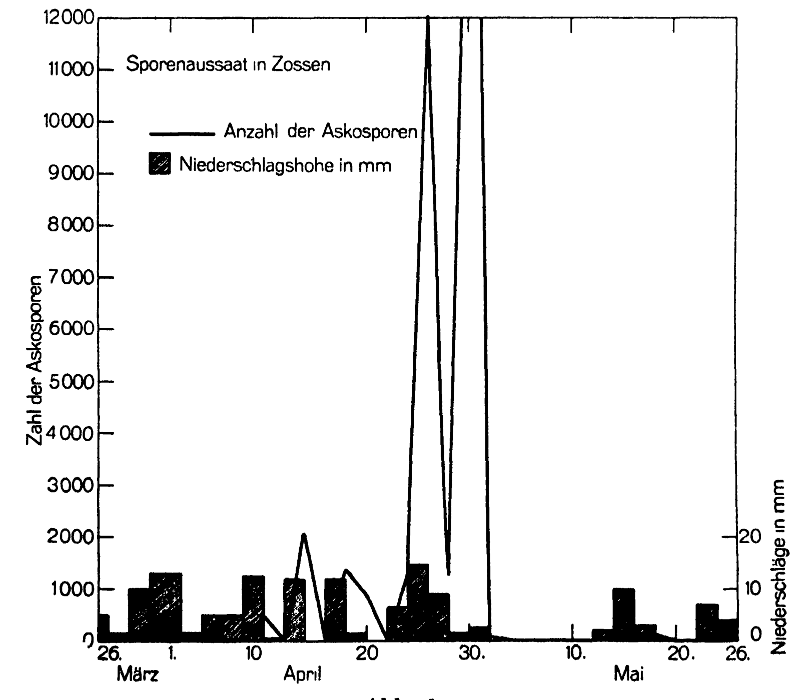


Abb. 1.

wurden diese ausgewechselt und auf den abgenommenen bei etwa 100facher Vergrößerung eine Fläche von 24 × 32 mm nach Askosporen abgesucht. Am 2. April wurden bei den Sorten Charlamowsky, Goldparmäne und Boskoop die ersten nennenswerten Mengen Askosporen gefunden. Die Einzelheiten über die Sporenaussaat auch bei den anderen Sorten sind aus der Tabelle 3 zu ersehen.

Tabelle 3.

Datum 1935	Zahl der Askosporen: Landsberger Renette	Baumanns Renette	Kaiser Wilhelm	Charlamowsky	Weißer Klarapfel	Goldparmäne	Boskoop	Niederschlagsmengen in mm	Temp. °C im Mittel
26. 3.	0	3	0	0	0	0	1	5,0	2,5
28. 3.	0	0	0	0	0	0	0	1,5	5,3
30. 3.	0	0	0	2	0	0	0	10,0	— 0,3
2. 4.	0	0	0	81	0	36	21	13,0	3,8
4. 4.	0	0	0	0	0	0	0	1,5	2,5
6. 4.	0	0	0	0	0	0	0	5,0	1,8
8. 4.	0	0	0	0	0	0	0	5,0	5,0
10. 4.	147	10	0	258	4	54	14	12,5	10,5
12. 4.	0	1	0	7	0	0	0	0,5	11,8
14. 4.	64	0	500	1200	0	270	24	12,0	4,8
16. 4.	0	0	0	0	0	0	0	0,0	7,3
18. 4.	210	0	26	1000	0	0	120	12,0	7,5
20. 4.	0	0	0	900	0	3	0	1,5	11,8
22. 4.	0	0	0	0	0	0	0	0,0	12,3
24. 4.	550	3	1	630	2	35	0	6,5	13,8
26. 4.	8 000	160	400	2600	6	800	61	14,5	11,8
28. 4.	650	9	330	173	1	63	60	9,0	10,3
30. 4.	22 000	0	500	19	12	160	6	1,5	6,8
2. 5.	0	0	0	0	0	70	0	2,5	1,8
4. 5.	0	0	0	0	0	0	0	0,0	8,0
6. 5.	0	0	0	0	0	0	0	0,0	12,8
8. 5.	0	0	0	0	0	0	0	0,0	11,3
10. 5.	0	0	0	0	0	0	0	0,0	8,8
12. 5.	0	0	0	0	0	0	0	0,0	10,5
14. 5.	0	—	32	0	0	2	1	2,0	6,3
16. 5.	11	0	16	1	0	1	3	10,0	8,0
18. 5.	63	72	4	1	0	0	43	3,0	7,0
20. 5.	4	0	0	0	2	5	1	0,5	8,3
22. 5.	0	0	0	0	0	0	0	0,0	13,8
24. 5.	10	1	0	11	0	8	0	7,0	15,3
26. 5.	10	1	0	0	0	4	7	4,0	15,5

In Abb. 1 ist die Summe der bei den untersuchten Sorten insgesamt ermittelten Askosporen dargestellt. Im Jahre 1935 wurden also die Askosporen, abgesehen von schwachen Aussaaten zwischen dem 14. April und 26. Mai, ausgeschleudert. Es ergibt sich aus der Tabelle 3, daß das Ausschleudern immer nur nach Regen erfolgt. Dabei ist nicht die Menge des Regens, sondern die Häufigkeit der Niederschläge maßgebend. Weiter ließ sich feststellen, daß die Temperatur nicht ohne Einfluß ist. Ende März bis Anfang April wurden trotz vieler Regentage nur wenige Sporen gefunden. Während dieser Zeit lag die mittlere Temperatur meist unter 5° C. Am 10. April stieg sie dann bis über 10° C. Nachdem nunmehr in den nächsten Tagen Regen niederging, nahm die Zahl der festgestellten Askosporen ganz

erheblich zu. Der stärksten Sporenaussaat am 24. April gingen ebenfalls einige Tage mit verhältnismäßig hohen Temperaturen voraus. Zusammenfassend läßt sich also sagen, daß für die Reifung der Askosporen höhere Temperaturen erforderlich sind und daß der Schleudervorgang durch Niederschläge ausgelöst wird. Diese Feststellungen decken sich mit denen von Frey und Keitt und Wiesmann.

2. Untersuchungen im Laboratorium über den Einfluß der Temperatur auf die Perithezienentwicklung.

Um die Frage des Einflusses der Temperatur auf die Entwicklung und Reifung der Perithezien näher zu untersuchen, führten wir weiter Versuche im Laboratorium durch. Zunächst wurden am 18. Febr. 1935 je 10 Blätter verschiedener Apfelsorten (Kaiser Wilhelm, Baumanns Renette, Charlamowsky, Weißer Klarapfel, Goldparmäne, Boskoop und Landsberger Renette) von draußen in konstante Temperaturen von 2,5, 6,5, 12,2 und 18° C gebracht. Zwischen die einzelnen Blätter wurde Filtrierpapier gelegt, das nur wenig angefeuchtet wurde, da die Blätter, vor allem bei höheren Temperaturen, leicht faulten. Der Durchmesser der Perithezien wurde zu Beginn des Versuches festgestellt. Nur bei der Sorte Baumanns Renette waren wenige hellgelbe Askosporen zu sehen. Bei der Untersuchung 13 Tage später wurde folgendes festgestellt: Bei 18° C enthielten die Blätter aller Sorten mit Ausnahme von Charlamowsky reife Perithezien, die Askosporen ausschleuderten. Bei 12° C schleuderten alle Sorten außer Goldparmäne und Kaiser Wilhelm, bei 6,5° C Baumanns Renette, Boskoop, Charlamowsky vereinzelt Askosporen. Bei 2,5° C waren bei keiner Sorte die Perithezien so gereift, daß Askosporen entlassen wurden. Die Anzahl der Askosporen in den Perithezien entsprach etwa derjenigen der im Freien überwinterten Blätter. In 13 Tagen waren also die Askosporen durchweg zur Reife gekommen.

Bei einem 2. Versuch wurden schon am 3. Dez. 1934 Blätter der Sorten Charlamowsky, Landsberger Renette, Boskoop und Minister von Hammerstein in Temperaturen von 2,5, 6,5, 12 und 18° C gebracht. Die Größe der Perithezien zu dieser Zeit ist aus der Tabelle 1 zu ersehen. In unregelmäßigen Abständen wurden einige Blätter untersucht. Bei 18 und 12° C zeigten die Perithezien bei allen Sorten keine oder nur eine geringe Größenzunahme. Am 7. März wurden die bei 12 und 18° C gehaltenen Blätter in 6,5° C überführt. Schon bei der nächsten Untersuchung am 13. März konnte eine Vergrößerung der Perithezien festgestellt werden. Am 25. März enthielten sie einige hellgelbe Askosporen. Bei den Blättern, die sich von Anfang an bei Temperaturen von 2,5 und 6,5° C befanden, ging die Entwicklung und Reifung der Perithezien weiter voran. Am 4. Febr. wurden bei der Sorte Charlamowsky in 6,5° C und am 13. Febr. in 2,5° C Perithezien mit hell gefärbten Askosporen gefunden. Einige Tage später wurden auch in den Blättern der anderen Sorten vereinzelt Askosporen beobachtet. Am 4. Febr. wurden einige Blätter aus 6,5° C und am 13. Febr. aus 2,5° C in 18° C gebracht. 10 Tage später konnten in beiden Fällen reife Perithezien festgestellt werden, während das bei den in 6,5 und 2,5° C verbliebenen Blättern erst am 6. bzw. 18. März der Fall war. Die Feststellungen Wiesmanns, der schon am 8. Jan. reife Perithezien erhielt, wenn er die Blätter von November an in einer feuchten Kammer bei 16° C hielt, konnten wir nicht bestätigen. Bei unseren Versuchen wurde die Entwicklung der Perithezien bei 18 und

auch bei 11—12° C gehemmt. Für die Reifung dagegen waren höhere Temperaturen erforderlich. Diese Feststellungen decken sich mit den Beobachtungen im Freiland.

3. Infektionsversuche.

a) mit Askosporen.

Bei der Besprechung unserer vorjährigen Ergebnisse hatten wir bereits darauf hingewiesen, daß der Einfluß von Temperatur und Feuchtigkeit auf die Infektion mit Fusicladium sich nur in Gewächshaus- bzw. Laboratoriumsversuchen einwandfrei feststellen läßt.

Untersuchungen dieser Art liegen bisher nur in geringem Maße vor, da künstliche Infektionen oft nicht gelingen. Die ersten Versuche in dieser Richtung machte Aderhold. Er infizierte abgeschnittene Zweige, einzelne Blätter und Topfbäumchen. Diese hielt er nach der Infektion in einer feuchten Kammer, die aus einer mit feuchtem Filtrierpapier ausgeschlagenen Glasglocke bestand. An den Topfbäumchen beobachtete er, wenn er mit Askosporen infizierte, einen Befall von 33% und bei Verwendung von Konidien einen solchen von 23%. Clinton erzielte bei seinen Versuchen keine Infektionen. Wallace steckte Apfelzweige am Baum in Lampenzylinder, deren Öffnungen er mit feuchter Watte abdichtete. Die Infektionen nahm er teils mit Konidien von Blättern, teils mit einer Aufschwemmung von Askosporen vor, die er durch Übergießen von zerkleinerten perithezienhaltigen Blättern mit Wasser gewonnen hatte. Der Prozentsatz der Infektionen, der auf diese Weise erhalten wurde, war nur gering. Keitt und Jones nahmen ihre Infektionen in feuchten Kammern vor, deren Wände mit Nesselstoff bespannt waren und die dadurch dauernd feucht gehalten wurden, daß über dem Dach eine Berieselungsanlage angebracht war. Die Kammern waren so groß, daß mehrere Topfbäumchen darin Platz hatten. Wiesmann verwendete die Methode von Aderhold, hatte jedoch nur geringe Erfolge. Rudloff spritzte bei seinen Versuchen Konidienaufschwemmungen in die Knospen und hatte damit gute Infektionen.

Nachdem wir im Jahre 1934 mit den Infektionsmethoden von Aderhold und Wallace keine befriedigenden Erfolge erzielt hatten, bauten wir uns 1935 eine Infektionskammer, die der von Keitt und Jones ähnlich ist. Die Einzelheiten dieser Infektionskammer sind aus der Abb. 2 zu ersehen.

Zur Infektion verwendeten wir zweijährige Sämlinge in Blumentöpfen (14 cm Durchmesser). Zum Versuch wurden die Bäumchen genommen, wenn sie 7—8 Blätter gebildet hatten. 4—6 Wochen nach der Auswertung einer Versuchsserie wurde der blättertragende Teil der Sämlinge abgeschnitten, der Stumpf gründlich mit schwefelhaltigen Mitteln abgewaschen und die Töpfe in einen dunklen Kellerraum gestellt. Etwa 4 Wochen später wurden sie ins Gewächshaus gebracht. Dort trieben die oberste oder die beiden obersten Knospen an der Spitze wieder aus. Die Sämlinge konnten während der Vegetationsperiode bis zu 5mal zurückgeschnitten werden, so daß wir immer junge und gleich alte Blätter im Versuch hatten.

Wenn auch bei der Verwendung von Sämlingen damit gerechnet werden muß, daß man nicht einheitliches Material hat, sondern solches verschiedener Anfälligkeit, so läßt sich doch durch Verwendung von einer größeren Anzahl von Sämlingen dieser Mangel in weitgehendem Maße beheben.

Infiziert wurde teils mit Askosporen, teils mit Konidien. Die Infektion mit Askosporen wurde auf folgende Weise vorgenommen: Überwinterte Blätter von 7 verschiedenen Apfelsorten wurden vermischt und, nachdem sie gründlich durchnäßt worden waren, auf Drahtnetzen über den Bäumchen in der Infektionskammer aufgehängt. Die Zahl der ausgeschleuderten Askosporen wurde durch „Sporenfallen“, die, wie auch bei den übrigen Ver-

suchen, aus mit Wollfett bestrichenen Objektträgern bestanden, festgestellt. Die Sporenfallen wurden unter dem Drahtnetz aufgehängt. Die Blätter wurden nach jedem Versuch getrocknet und konnten dann bald wieder für weitere Versuche verwendet werden.

Zunächst stellten wir fest, wann die Perithezien nach dem Befeuchten der Blätter mit der Sporenaussaat einsetzten, wann die meisten Sporen ausgeschleudert wurden und wie lange die Aussaat anhielt. Die Einzelheiten sind aus der Tabelle 4 zu ersehen. Es zeigte sich, daß schon ½ Std. nach dem Anfeuchten der Blätter die meisten Askosporen ausgeschleudert sind.

Tabelle 4.

Anzahl der Askosporen nach:

5′	10′	15′	30′	60′	2 Std.	3 Std.	4 Std.	5 Std.	6 Std.	7 Std.
0	0	45	32	24	3	6	1	0	0	0
0	3	47	84	21	14	40	1	1	3	0
0	0	28	38	9	0	0	0	0	0	0
1	34	52	62	9	2	2	1	0	0	0
0	31	108	19	9	1	1	0	0	0	0
0	25	120	46	5	0	1	0	1	0	0

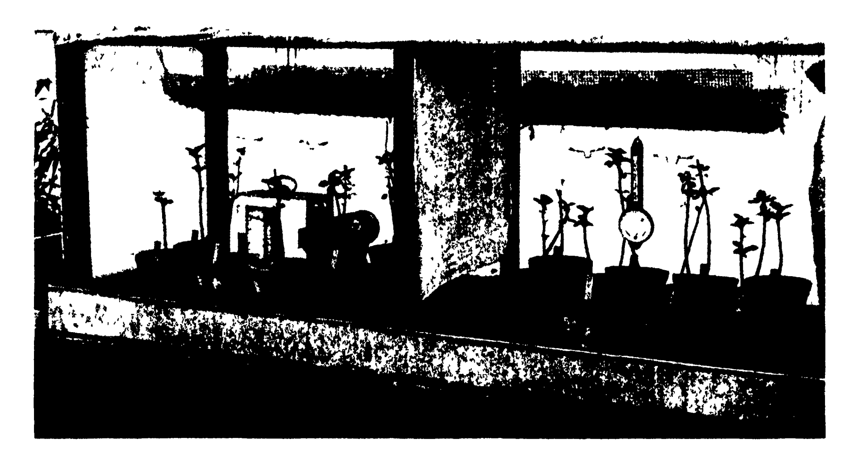


Abb. 2.

Wiesmann warf die überwinterten Blätter erst 1 Std. in Wasser, und stellte dann die Zahl der ausgeschleuderten Sporen fest. Er beobachtete 5 Min. nach Beginn des Versuches eine starke Aussaat, die etwa 50 Min. anhielt. Nach 70 Min. fand er keine Askosporen mehr. Bei unseren Versuchen konnten wir bei Blättern, die sich vorher 1 Std. in Wasser befanden, nur noch wenige Askosporen ermitteln. Wir verfuhren deshalb bei unseren Versuchen nicht wie Wiesmann, sondern besprühten die Blätter 5 Min. lang mit Leitungswasser und breiteten sie dann auf dem Draht über den Topfbäumchen aus.

Für die Infektionsversuche unter konstanten Bedingungen verwendeten wir kleinere Infektionskammern, die nur 10 Bäumchen faßten, während in den großen Kammern (Abb. 2) in 4 Abteilungen insgesamt 48 Topfbäumchen untergebracht werden konnten.

Die relative Luftfeuchtigkeit und die Temperatur wurden in den Infektionskammern und im Gewächshaus, in dem die Bäumchen nach der Infektion aufgestellt

wurden, mittels Thermohygrographen gemessen. Die Sämlinge wurden kurz vor der Infektion mit Leitungswasser benetzt, nach dem Herausnehmen aus der Infektionskammer die Blätter dagegen trocken gehalten. Im Gewächshaus wurde eine verhältnismäßig hohe Luftfeuchtigkeit dadurch geschaffen, daß Wasser durch Düsen fein gegen die Unterseite der Tischplatte gespritzt wurde und das Wasser dann auf eine Koksschicht tropfte.

Die Sämlinge wurden nach der Infektion täglich beobachtet und der Zeitpunkt, an dem die ersten Konidienrasen auf den Blättern auftraten, ermittelt. Die Schätzung des Gesamtbefalls wurde 3 Wochen nach der Infektion vorgenommen. Er wurde auf folgende Weise erhalten: Die Befallsstärke der einzelnen Sämlinge wurde nach Ewert abgeschätzt:

1 = schwacher Befall
2 = gleichmäßiger Befall
3 = mittelstarker Befall
4 = starker Befall
5 = sehr starker Befall

Daraus wurde die mittlere Befallsstärke durch Addieren der einzelnen Befallsstärken und dann durch Dividieren der insgesamt infizierten Sämlinge berechnet. Der Befall war bei entsprechend günstigen Bedingungen, wie aus Abb. 3 zu ersehen ist, ziemlich stark. Blieben stark befallene Samlinge länger als 4 Wochen stehen, so erkrankten' sie meist so stark, daß das Laub abgeworfen wurde und sie eingingen.



Abb. 3.

Die Versuchsanordnung wechselte bei den Versuchen je nach dem, welcher Faktor hinsichtlich seines Einflusses auf den Fusicladiumbefall geprüft werden sollte. Die Einzelheiten sind aus Tab. 5 zu ersehen.

Aus den Versuchen geht also hervor, daß bei Temperaturen von 16—27° C zur Zeit der Infektion und von 14—24° C nach der Infektion die Inkubationszeit 9—14 Tage beträgt. Die Bäumchen müssen zur Infektion mindestens 5 Std. in der Infektionskammer verbleiben. Stehen sie nach der Infektion im Dunkeln, so kommt die Krankheit zwar nicht zum Ausbruch, doch erfolgt dieser sofort, wenn die Bäumchen unter normale Bedingungen gebracht werden, und der Befall ist dann besonders stark. Niedrige Temperatur zur Zeit der Infektion verhindert diese nicht, wenn auch der Befall geringer war als bei höheren Temperaturen. Bei den Bäumchen, die nach der Infektion 7 Wochen bei 2° C im Dunkeln gehalten wurden, unterblieb die Infektion nicht, und als sie ins Gewächshaus gebracht wurden, erschien nach kurzer Zeit ein starker Befall.

Aus den Versuchen ist ferner zu erkennen, daß einzelne Sämlinge nicht befallen wurden. Bei einigen von diesen wurde folgende Erscheinung beobachtet: 10—14 Tage nach der Infektion traten auf den Blättern helle Flecken von 1—2 mm Durchmesser auf (Abb. 4). Die Blätter begannen sich bald

Tabelle 5. Infektion mit Askosporen.

Vers. Nr.	Zahl der infizierten Bäumchen	Die Bäumchen blieben in d. Infektionskammer	Zahl der Sporen auf den Fallen	Temp. in der Infektionskammer °C von	Temp. in der Infektionskammer °C bis	% Relat. Luftfeuchtigkeit in d. Infektionskammer von	% Relat. Luftfeuchtigkeit in d. Infektionskammer bis	Temp. n. d. Infektion von	Temp. n. d. Infektion bis	% relat. Luftfeuchtigkeit n. der Infektion von	% relat. Luftfeuchtigkeit n. der Infektion bis	Auftreten d. ersten Konidienrasen n. Tagen	Stärke des Befalls n. 3 Wochen	Zahl der befallenen Bäumchen
1	24	13 Tage	75	17	22	85	99					12	4,4	23
2	16	48 Std.	45	19	24	73	99					9	3,8	16
3	16	48 ,,	163	21	27	73	85					14	3,5	12
4	16	48 ,,	81	21	23	70	88					10	3	14
5	16	48 ,,	140	16	16	88	92					9	3,9	16
6	16	48 ,,	190	18	24	90	91					12	3,1	15
7	6	½ ,,						14	24	40	87	—	0	—
8	6	1 ,,										—	0	—
9	6	2 ,,	n. 6 Std.									—	0	—
10	6	3 ,,	160	16	20	92	93					—	0	—
11	6	4 ,,										—	0	—
12	6	5 ,,										11	3,1	6
13	6	6 ,,										11	3,8	6
14	6[1]	24 ,,						0,9	5,1	—	—	—	0	—
15	6[1]	24 ,,	172	16	18	90	91	14,3	17	—	—	—	0	—
16	6[1]	24 ,,						18	20	—	—	—	0	—
14a	Vers. 14—16; nach 14 Tagen ins Gewächshaus gebracht											7	n. 15 Tag. 4,7	5
15a												5	n. 13 Tag. 4,2	6
16a												3	n. 11 Tag. 4,2	5
17	6[1]	24 Std.	172	16	18	90	91	7 Wochen 0,9	5,1	—	—	—	0	—
17a	Vers. 17; nach 7 Wochen ins Gewachshaus gebracht											5	4	6
18	12	24 Std.	145	6	10	90	90	14	24	40	87	9	2,2	12
19	12	24 ,,	223	—2	11	90	90	14	24	—	—	10	1	12
20	12	24 ,,		15	16	90	100	0	20	—	—	18	3,3	12
21	12	24 ,,		2	10	75	90	16	24	40	87	12	1,9	12

[1]) Nach der Infektion dunkel gehalten.

zu kräuseln. Bei der Untersuchung derartiger Blätter nach der Methode von Holz zeigte sich, daß die hellen Stellen auf den Blättern die Folge von Infektionen mit Fusicladium waren. Das Myzel wucherte unter der Kutikula, und nur selten kam es zur Konidienbildung. Es handelt sich also hier um einen latenten Befall, der erhebliche Schädigungen der Wirtspflanze hervorrufen kann, der aber bisher noch nicht als solcher festgestellt werden konnte, da die entsprechende Untersuchungsmethode fehlte.

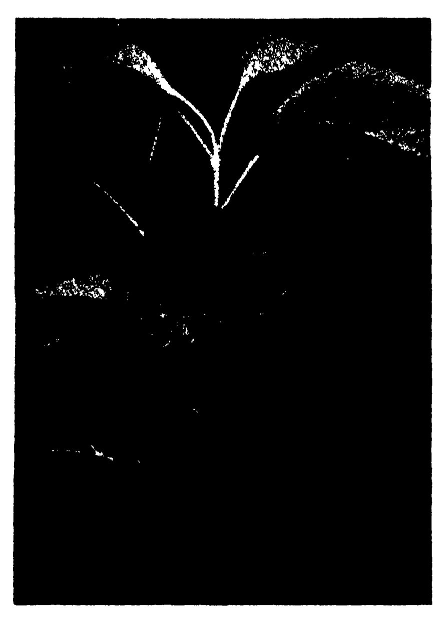


Abb. 4.

b) mit Konidien.

Von Mitte Juli an, als Askosporen nicht mehr zur Verfügung standen, wurden Konidien zur Infektion benutzt, die von Blattinfektionen stammten. Die Konidien wurden von den Blättern mit einem Pinsel abgenommen, in destilliertes Wasser übertragen und mit einer Fixativspritze auf die Bäumchen gebracht. Die Einzelheiten der Versuche sind aus Tabelle 6 zu entnehmen.

Die Versuche zeigen, daß die günstigste Temperatur für die Infektion mit Konidien etwa 19° C ist. Die Inkubationszeit beträgt bei dieser Temperatur 8—10 Tage. Bei niedrigeren Temperaturen geht die Infektion ebenfalls vor sich, der Befall ist aber wesentlich geringer. Bei Bäumchen, die 8 Tage vor der Infektion dunkel gehalten waren, bei denen also insbesondere Assimilations- und Transpirationsvorgänge gestört waren, wurden bedeutend stärker befallen als solche, die unter normalen Bedingungen im Gewächshaus gestanden hatten.

c) mit Myzel an abgeschnittenen Blättern.

Weitere Versuche wurden dann noch an abgeschnittenen Apfelblättern vorgenommen. Wenn auch die Vorgänge im abgeschnittenen Blatt nicht denen im Blatt am Baum entsprechen, so gaben doch die Versuche einen guten Einblick in das Wachstum von Fusicladium im Blatt, über das wir bis jetzt kaum unterrichtet sind. Mit abgeschnittenen Blättern arbeitete auch Wiesmann. Allerdings erhielt er bei Infektionen mit Konidien nur selten makroskopisch sichtbare Konidienrasen. Die Infektionen wurden mit Myzel von Fusicladium vorgenommen, da zur Zeit dieser Versuche keine Sporenformen des Pilzes zur Verfügung standen. Das Myzel stammte von einer Kultur aus dem Jahre 1934.

Als Nährboden wurde Hafermehlagar von folgender Zusammensetzung gewählt: 1 l Aqua dest., 30 g Hafermehl, 20 g Agar-Agar, 5 ccm Glyzerin und 10 Tropfen Milchsäure. Auf diesem wuchs Fusicladium sehr gut, bildete aber keine Konidien. Für die Versuche wurden die Kulturen im Reagenzglas mit Aqua dest. tüchtig durchgeschüttelt und wenn nötig, mit einem rechtwinklig gebogenen Platindraht durchgequirlt, so daß das Myzel in kleine Stückchen zerteilt wurde. Zur Infektion wurden abgeschnittene Blätter in die Myzelaufschwemmung eingetaucht und dann in Deckel-

schalen (20 cm Durchmesser und 10 cm Höhe), die mit feuchtem Filtrierpapier ausgelegt waren, gebracht. Die Schalen wurden dann den Bedingungen ausgesetzt, deren Einfluß auf das Wachstum festgestellt werden sollte. Nach der Infektion wurden die Blätter nach der Methode von Holz untersucht. Mit dieser Methode war es möglich, das Wachstum des Pilzes unter der Kutikula eingehend zu verfolgen. Bei allen Ver suchen wurde nur die Oberseite der Blätter nach Befallsstellen abgesucht. Einzelheiten sind aus den Abbildungen und Tabellen zu ersehen.

Tabelle 6. Infektion mit Konidien.

Vers.-Nr.	Zahl der infizierten Bäumchen	Die Bäumchen blieben in der Infektionskammer	Temperatur in der Infektionskammer in °C von	bis	% Relative Luftfeuchtigkeit von	bis	Temperatur nach der Infektion von	bis	Relat. Luftfeuchtigkeit nach der Infektion von	bis	Auftreten der ersten Konidienrasen nach Tagen	Stärke des Befalls nach 3 Wochen	Zahl der befallenen Bäumchen
1	36	48	18	22	90	96					8	4,2	30
2	38	96	18	22	90	96					10	3,5	28
3	6		0,9	5,1	—	—					13	0,5	4
4	6		14,3	17	—	—					12	3,5	6
5	6		18	20	—	—					10	4,3	6
6	6		22,5	25	—	—					12	2,2	6
7	6		0,9	5,1	—	—					11	1	4
8	6	48	14,3	17	—	—					11	3	5
9	6		18	20	—	—					9	4,5	5
10	6		22,5	25	—	—					13	1,1	5
11	6		0,9	5,1	—	—	17	26	36	80	13	0,4	1
12	6		14,3	17	—	—					10	1	3
13	6		18	20	—	—					10	4,1	5
14	6		22,5	25	—	—					13	2	5
15	10[1]		0,9	5,1	—	—					8	2,4	4
16	10[1]		14,3	17	—	—					8	3,6	8
17	10[1]		18	20	—	—					7	4,5	10
18	10[2]	24	0,9	5,1	—	—					10	0,1	2
19	10[2]		14,3	17	—	—					9	2	6
20	10[2]		18	20	—	—					6	4	7
21	10		22,5	25	—	—					6	1,8	6

[1]) Die Bäumchen wurden bereits 8 Tage vor der Infektion in die entsprechenden Temperaturen ins Dunkle gebracht. Die bei 22,5—25° C gehaltenen Bäumchen wurden durch Mehltau vernichtet.

[2]) Bäumchen wurden vor der Infektion im Gewächshaus gehalten.

Beim ersten Versuch wurden je 5 gleich alte Blätter von Apfelsämlingen, die im Gewächshaus gewachsen waren, infiziert und in Temperaturen von 0,3, 6,9, 14, 19, 22, 25, 27 und 30° C gebracht. Das Ergebnis der Untersuchung am 5. Tage ist aus der Abb. 5 zu entnehmen. Die optimale Temperatur für das Wachstum liegt bei 19° C. Bei höheren Temperaturen nimmt es ab, und bei 30° C finden keine Infektionen mehr statt.

Bei einem weiteren Versuch wurden die Blätter nach der Infektion bei Temperaturen von 0,6, 14, 19, 24 und 30° C aufgestellt. In bestimmten Zeitabständen wurden jedesmal 10 Blätter untersucht. Es wurde der größte Durchmesser der einzelnen Infektionsstellen (a) und der von Myzel durchzogenen Fläche in Prozenten der Gesamtblattfläche (b) festgestellt. Einzelheiten ergeben sich aus der Tabelle 7.

Aus der Tabelle geht ebenfalls hervor, daß die günstigste Temperatur für das Wachstum von Fusicladium 19° C ist. Aber selbst bei 0° C sind nach

6 Tagen Infektionen sichtbar. Bei 24° C ist das Wachstum in den ersten 10 Tagen nach der Infektion zwar ziemlich stark, doch treten vom 3. Tage an keine Neuinfektionen mehr auf. Die Ursache liegt darin, daß die abgeschnittenen Blätter bei Temperaturen über 20° C schon nach einigen Tagen zu faulen beginnen. Bei 30° C wurde bei diesem Versuch am 4. Tage eine Infektionsstelle beobachtet. Da bei Temperaturen über 14° C die Blätter spätestens nach 10 Tagen abstarben, konnten die Infektionen bei diesen Temperaturen nicht weiter verfolgt werden.

Tabelle 7.
Das Wachstum von Fusicladium dendr. im Blatt bei verschiedenen Temperaturen.

a = der großte Durchmesser der Infektionsstellen.
b = Prozentsatz der Blattfläche, die vom Myzel durchwuchert war.

Temp. °C	Nach Tagen 2		3		4		6		7		10	13	15	17	24
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	a	a	a	a
0	0	0	0	0	0	0	20	60	34	100	64	80	120	210	430
6	0	0	16	60	48	100	112	100	120	100	250	340	450	660	920
14	20	20	80	80	200	100	672	100	752	100	1130	1500	—	—	—
19	64	80	320	80	368	100	960	100	1040	100	1400	—	—	—	—
24	10	5	126	10	144	10	292	10	490	10	680	—	—	—	—
30	0	0	0	0	90	1 Inf.-stelle	0	0	0	0	—	—	—	—	—

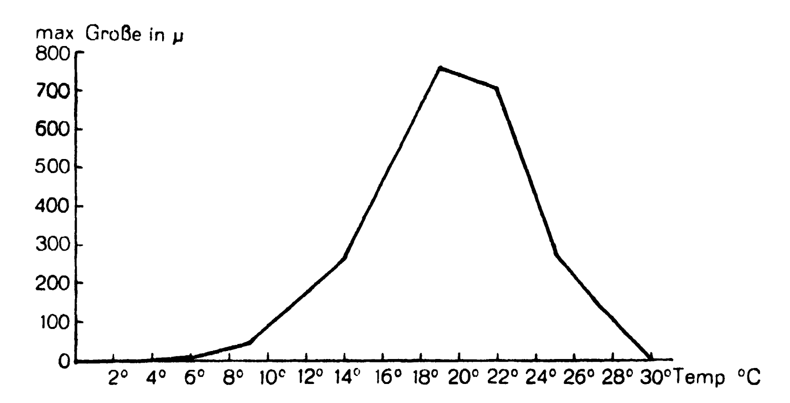


Abb 5. Wachstum von Fusicl. dendr. bei verschiedenen Temperaturen. Untersuchungstermin: 5. Tag nach der Infektion.

Bei einem 3. Versuch wurden die Blätter nach der Infektion bei 14° C gehalten und das Wachstum, 1 Std. nach der Infektion beginnend, laufend untersucht. Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist in Abb. 6 wiedergegeben. Zu bemerken ist noch, daß vom 8. Tage an Konidienpolsterbildung beobachtet wurde. Zur Konidienbildung kam es aber nicht. Gleichzeitig mit diesem Versuch wurden 6 zweijährige Sämlinge infiziert und bei 14° C aufgestellt. Am 8. Tage wurden sämtliche 36 Blätter von 4 Sämlingen abgeschnitten und untersucht. Es zeigte sich, daß die Entwicklung des Pilzes in den Blättern am Sämling bis zum 8. Tage nicht schneller als in den abgeschnittenen Blättern vor sich gegangen war. Bei der Untersuchung der Blätter der übrigen Sämlinge war am 14. Tag jedoch ein deutlicher Unter-

schied zu erkennen. Während in den abgeschnittenen Blättern nur Konidienpolster gebildet waren, zeigten sich auf den Blättern der Sämlinge bei 10-facher Vergrößerung Konidienrasen.

Um den Einfluß des Lichtes auf das Wachstum von Fusicladium zu untersuchen, wurden je 40 Blätter bei Zimmertemperatur unter einem Dunkelsturz und in diffusem Tageslicht aufgestellt. Bei der Untersuchung nach 11 Tagen zeigte sich ein deutlicher Unterschied in der Stärke des Befalls. Bei den dem Tageslicht ausgesetzten Blättern waren etwa 38%, bei den im Dunkeln gehaltenen aber etwa 62% der Blattflächen befallen. Diese Feststellungen decken sich mit den Beobachtungen von Keitt und Jones, die dann, wenn sie infizierte Apfelbäumchen nach der Infektion 4—5 Tage dunkel hielten, die doppelte Anzahl von Fusicladium-Flächen auf den Blättern erhielten, als wenn sie dauernd im Licht blieben. Auch bei unseren Infektionen mit Konidien zeigten die Sämlinge, die vor der Infektion dunkel gehalten wurden, stärkere Infektionen als die dem Licht ausgesetzten.

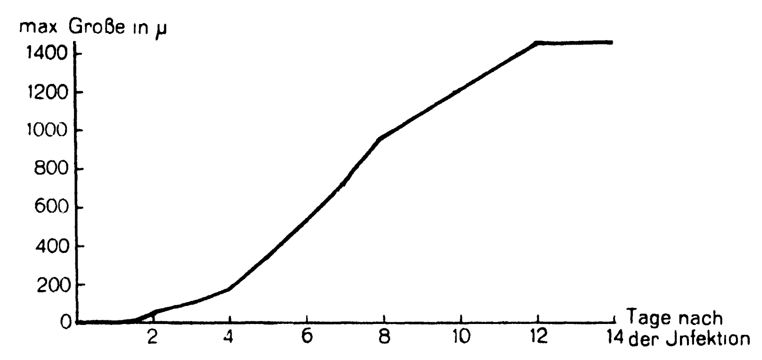


Abb. 6. Wachstum von Fusicl. dendr. innerhalb von 14 Tagen nach der Infektion bei 14° C.

Weitere Infektionen wurden mit verschieden alten Blättern von Apfelsämlingen angestellt.

Das Alter der Blätter ist durch Zahlen von 1—5 ausgedrückt:

1 = jüngste Blätter, hellgrün, nicht entfaltet
2 = Blätter eben entfaltet, aber noch hellgrün
3 = ,, entfaltet und wesentlich größer
4 = ,, dunkelgrün und hart
5 = die ältesten Blätter am Sämling.

Von jedem Altersstadium wurden 30 Blätter von 30 verschiedenen Sämlingen genommen. Nach der Infektion wurden die Blätter 7 Tage bei 14° C gehalten.

Die Ergebnisse der Versuche sind in Tabelle 8 zusammengestellt, und zwar sind die Mittelwerte der 30 Blätter angegeben.

Der gleiche Versuch wurde noch mit abgeschnittenen Blättern von einjährigen Veredelungen der Sorten Boskoop und Goldparmäne durchgeführt. Diese Blätter waren im allgemeinen kräftiger entwickelt, da die Bäumchen im Freiland standen. Das Stadium 5 war schon dunkelgrün, glänzend und lederig hart. Von jedem Stadium wurden 20 Blätter infiziert und 12 Tage nach der Infektion untersucht. Die Befunde sind in Tabelle 9 und 10 dargestellt.

Tabelle 8. Myzelinfektionen auf Blättern verschiedenen Alters.

Blatt-stadium	Größter Durchmesser im Mittel v. 30 Bl. in μ	Bemerkungen
1	336	Sehr viele Infektionen.
2	704	,, ,, ,,
3	464	,, ,, ,,
4	320	Auf der Blattfläche vereinzelt Infektionsstellen, vor allen Dingen an den Übergangsstellen von Stiel und Blatt.
5	112	Von 30 untersuchten Blättern nur auf 5 Blättern 1—2 Infektionsstellen gefunden.

Tabelle 9.
Myzelwachstum auf Blättern verschiedenen Alters. Sorte Goldparmäne.

Blatt-stadium	Größter Durchmesser im Mittel v. 20 Bl. in μ	Bemerkungen
1	—	Wegen zu starker Behaarung der Blätter keine Infektionen zu sehen.
2	960	Sehr viele Infektionen über das ganze Blatt verteilt.
3	720	Sehr viele Infektionen hauptsächlich an der Blattbasis.
4	128	Viele Infektionen.
5	48	Vereinzelt Infektionen.

Tabelle 10.
Myzelwachstum auf Blättern verschiedenen Alters. Sorte Boskoop.

Blatt-stadium	Größter Durchmesser im Mittel v. 20 Bl. in μ	Bemerkungen
1	480	Sehr viele Infektionen über das ganze Blatt verteilt.
2	832	Sehr viele Infektionen über das ganze Blatt verteilt.
3	112	Vereinzelt Infektionsstellen.
4	80	Ganz vereinzelt Infektionen, und zwar nur an der Blattbasis.
5	24	Von 20 Blättern nur auf 3 Blättern ganz vereinzelt Infektionen gesehen.

Unsere Versuchsergebnisse decken sich mit den Beobachtungen von Aderhold, Clinton, Wiltshire und Wiesmann, die feststellten, daß jüngere Blätter stärker von Fusicladium befallen werden als ältere. Keitt und Jones fanden bei ihren Versuchen, daß bei einem bestimmten Alter die Blätter besonders anfällig sind. Sie teilten die Blätter an eingetopften Apfelbäumchen in 13 Gruppen ein, dabei war 1 das älteste, 13 das jüngste Stadium. Besonders anfällig war das Stadium 9 oder 10. Auch wir konnten die Feststellung machen, daß das Wachstum des Pilzes nicht in den jüngsten, noch kaum entfalteten Blättern, sondern erst in den nächst älteren am schnellsten vor sich geht. Die Zahl der Infektionen nahm vom 4. Stadium an ab. Es war auffallend, daß bei den älteren Blättern die meisten Infektionsstellen an der Blattbasis oder auf dem Blattstiel gefunden wurden. Diese Beobachtung kann man vielfach auch im Spätsommer im

Freien machen, wo der Neubefall besonders stark auf den Blattstielen zu beobachten ist.

Ob die Dicke der Kutikula oder Unterschiede in der Zellsaftkonzentration verschieden alter Blätter Fusicladium am Eindringen hindern oder ob das Wachstum im Blatt gehemmt wird, muß noch durch weitere Versuche geklärt werden.

Eine Beobachtung bei den Infektionen bei 0, 3 und 6° C ist noch bemerkenswert. Vom 3. bis 5. Tag nach der Infektion konnten deutliche Veränderungen der Stellen der Hyphen beobachtet werden, die mit dem Blatt in unmittelbare Berührung kamen. Die das Blatt berührende Stelle der Hyphe verbreiterte sich und sah einem „Appressorium“, wie es von der keimenden Spore häufig vor dem Eindringen gebildet wird, sehr ähnlich. Diese Gebilde mußten auch dieselbe Funktion haben, denn wenn bei starkem Kochen in Kalilauge die großen Hyphenknäuel abgerissen waren, blieben Hyphenreste mit dem „Appressorium“ an der Blattoberfläche haften. Bei Temperaturen über 10° C unterblieb die Bildung solcher Haftorgane fast vollkommen. Die auf dem Blatt liegende Hyphe drang hier meistens unmittelbar an der Berührungsstelle ins Blatt ein und wuchs in der Richtung, in der sie auf dem Blatt lag, unter der Kutikula weiter (Abb. 7), während bei niedrigen Temperaturen die Hyphen nach der „Appressorium“-Bildung wie bei einer Sporeninfektion sich sternförmig unter der Kutikula verbreiteten.



Abb. 7. 6 Tage alte Myzelinfektionsstellen bei 14° C. Vergr. 460 fach.

Bei Infektionen mit Konidien zeigte sich diese Erscheinung ebenfalls. Bei niedrigen Temperaturen keimten die Sporen innerhalb von 2—3 Tagen auf dem Blatt aus, bildeten dann ein Haftorgan, unter dem einige Tage später, je nach der Temperatur, die erste Myzelbildung im Blatt zu sehen war. Trat bei höheren Temperaturen Appressorienbildung auf, konnte man häufig beobachten, daß aus dem Appressorium eine neue Hyphe herauswuchs und an einer zweiten Stelle ein neues Appressorium bildete oder aber nach kurzer Zeit unmittelbar ins Blatt eindrang. Auf die Appressorienbildung wies zuerst Aderhold hin. Später wurden seine Beobachtungen aber von Wallace, Keitt und Hamilton nicht bestätigt. Die unterschiedlichen Ergebnisse sind vielleicht dadurch zu erklären, daß bei

verschiedenen Temperaturen gearbeitet wurde. Bei höheren Temperaturen werden Appressorien nur dann gebildet, wenn durch irgendwelche Widerstände die Hyphe am Eindringen gehindert wird. Man kann das sehr gut beobachten, wenn man Sporen auf einer Glasplatte keimen läßt.

Zusammenfassend läßt sich über die Infektionsversuche mit Myzel sagen, daß die günstigste Temperatur für das Wachstum etwa 19° C ist. Die bisherige Ansicht, daß Infektionen an abgeschnittenen Blättern nur selten angehen, beruht darauf, daß in abgeschnittenen Blättern Fusicladium nur selten zur Konidienbildung kommt und daß bisher das Wachstum im Blatt nicht verfolgt werden konnte.

II. Die Bekämpfung des Fusicladiums.

1. Sporenflug und Infektion.

Die Versuche zur Bekämpfung von Fusicladium wurden 1935, wie im Vorjahre, in der Obstanlage des Herrn Welter in Zossen durchgeführt. Um einen Überblick über die in der Luft vorhandenen Sporen zn haben, wurden, wie im vorigen Jahr, „Sporenfallen" aufgehängt, und zwar an den unteren Zweigen von Buschbäumen 30—50 cm über dem Boden. Die 20 Sporenfallen wurden vom 25. März an bis zum 28. Juni jeden 2. Tag, von da an 2mal in der Woche ausgewechselt. Untersucht wurde jeweils eine Fläche von 24×32 mm.

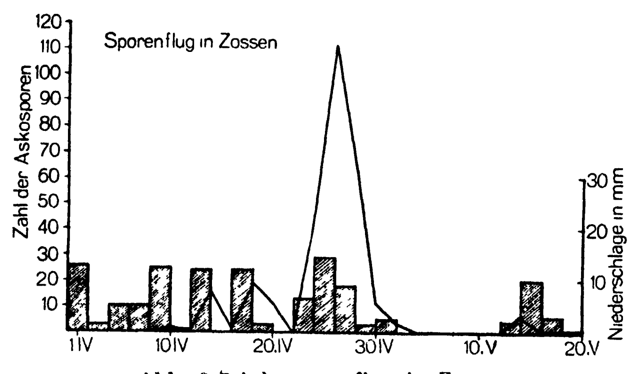


Abb. 8. Askosporenflug in Zossen.

In Abb. 8 ist die Summe der auf den 20 Sporenfallen festgestellten Askosporen eingezeichnet. Die ersten Askosporen wurden am 10. April festgestellt, größere Mengen am 14. und 18. April. Die meisten Sporen wurden am 26. April gezählt, und zwar 122. Verhältnismäßig groß war die Zahl auch noch am 28. April. Nach einer 10 tägigen Trockenperiode wurden am 14., 16. und 18. Mai die letzten Askosporen in diesem Jahre gefunden. Im Jahre 1934 setzte der Sporenflug ebenfalls am 10. April ein und war am 23. Mai beendet. Der Flug fällt also 1934 und 1935 fast genau in dieselbe Zeit.

Vergleichen wir die Abb. 1 und 8 miteinander, so fällt auf, daß sich die Kurven fast vollkommen decken. Diese Feststellung ist insofern von Bedeutung, als man durch Beobachtung der Sporenaussaaten bei den gesammelten Blättern Aufschluß über die Zahl der in der Luft vorhandenen Sporen erhalten kann, Voraussetzung ist allerdings, daß die Beobachtung sich auf möglichst viele in der betreffenden Anlage vorhandenen Sorten erstreckt.

Das Aufbrechen der Knospen erfolgte 1935 Ende März. Infolge der niedrigen Temperaturen in der nächsten Zeit ging die Entwicklung nur langsam voran. Während dieser Zeit reiften auch die Askosporen in den überwinterten Blättern nicht aus. Erst mit steigender Temperatur vom 8. April

ab konnten die Perithezien zur Reife kommen und auch die Entwicklung der Knospen nahm ihren Fortgang. Als 2 Tage später die ersten Askosporen in der Luft vorhanden waren, waren an den aufgebrochenen Knospen die Spitzen der Primärblättchen soeben zu sehen. Am 16. April, also zwischen dem 2. und 3. Sporenflug, begannen sich die noch unentfalteten Blättchen auf der einen Seite der Knospe zurückzubiegen, während sie auf der anderen Seite noch steil in die Höhe gerichtet waren. Während des stärksten Sporenfluges am 26. April waren die Primärblätter vollkommen entfaltet und die Blütenknospen befanden sich im Rötungsstadium. Durch niedere Temperaturen wurde der Termin der Blüte etwas verzögert. Infolge stärkerer Niederschläge befanden sich zu dieser Zeit größere Mengen von Askosporen in der Luft. An den Apfelbäumen waren die Primärblättchen vollkommen entfaltet. Die Apfelblüte dauerte etwa vom 8. bis zum 22. Mai. Die während dieser Zeit in der Luft vorhandenen Askosporen waren zahlenmäßig unbedeutend.

Um festzustellen, wieweit eine Infektion stattgefunden hatte, wurden von den in der Tab. 11 aufgeführten Apfelsorten je 7 Primärblättchen abgepflückt und nach der Methode von Holz untersucht. Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist in Tab. 11 dargestellt. Die Zahlen geben die Anzahl der Infektionsstellen an, die auf den Blättern der verschiedenen Sorten gefunden wurden. Es wurden alle Übergänge von der eben ausgekeimten Askospore bis zum Thallus, bei dem die ersten Konidienpolster zu sehen waren, beobachtet. Konidien selbst wurden aber noch nicht ermittelt. An anderer Stelle ist bereits berichtet worden, daß diese ersten Infektionen immer durch Askosporen und nie durch Konidien verursacht wurden.

Tabelle 11. Zahl der Infektionsstellen je Blatt.

Blatt Nr.	Landsberger Renette	Prinzenapfel	Weißer Klarapfel	Charlamowsky	Baumanns Renette	Kaiser Wilhelm	Cox Orange
1	2	1	1	0	126	1	27
2	4	0	0	0	1	5	73
3	3	46	0	0	68	1	8
4	8	1	0	5	32	0	46
5	2	4	0	0	38	1	67
6	6	1	0	1	30	3	134
7	15	19	0	0	96	9	9

Aus der Tabelle geht hervor, daß besonders bei den Sorten Baumanns Renette und Cox Orange starke Infektionen stattgefunden hatten. Die Zeit vom 18.—30. April war für die Infektion und die Entwicklung von Fusicladium sehr günstig; während dieser ging oft Regen nieder und außerdem lagen die Temperaturen zwischen 10 und 20° C. Bei einer weiteren Untersuchung am 5. Mai konnten die Ergebnisse vom 30. April bestätigt werden. Mikroskopisch waren schon Konidienrasen zu erkennen. Makroskopisch war das erst am 10. Mai der Fall. Auf den Sporenfallen wurden Konidien erst am 14. Mai gefunden. Mit der Zunahme des Blattbefalls stieg auch in der nächsten Zeit die Anzahl der auf den Sporenfallen festgestellten Konidien, deren Bildung den ganzen Sommer über je nach der Witterung bis zum Herbst festgestellt wurde.

2. Spritzversuche.

Für die Spritzversuche standen in der Obstanlage des Herrn Welter etwa 300 Bäume von 9 Sorten zur Verfügung. Der Plan für die Spritzversuche ist aus Tab. 12 zu ersehen. Gespritzt wurde mit Kupferkalkbrühe (Cu) 1% und Schwefelkalkbrühe (S) 3%.

Tabelle 12. Spritzplan 1935.

Parzelle	Spritztermin	Bemerkungen
I	12. April	2 Tage nach dem 1. Askosporenflug gespritzt
II	26. „	Zur Zeit des stärksten Askosporenfluges gespritzt
III	12. April	2 Tage nach dem 1. Askosporenflug gespritzt
	30. „	4 Tage nach dem stärksten Askosporenflug gespritzt
IV	14. April	4 Tage nach dem 1. Askosporenflug bis z. Zt. des stärksten Askosporenfluges gespritzt
	20. „	
	26. „	
V	Unbehandelt	

Durch starke Maifröste wurde die Blüte in den Versuchsparzellen vollständig vernichtet, so daß der Fruchtbefall nicht ermittelt werden konnte. Wir mußten uns daher mit der Schätzung des Blattbefalls begnügen. Die Zahlen sind nach Ewert angegeben:

0 = kein Befall	2 = mäßiger Befall	4 = starker Befall
1 = schwacher Befall	3 = mittelstarker Befall	5 = sehr starker Befall.

Die Feststellung des Befalls wurde am 22. Mai, 13. Juni und 2. Aug. vorgenommen (Tabelle 13).

Aus der Tabelle geht ohne weiteres hervor, daß eine Spritzung 2 Tage nach dem 1. Sporenflug zwecklos war. Da die Knospen gerade erst aufgebrochen waren, konnte der auf ihnen lagernde Spritzbelag bei der schnellen Weiterentwicklung keine vorbeugende Wirkung mehr haben.

Bei einer Spritzung z. Zt. des stärksten Sporenfluges am 26. April waren anscheinend schon zu viele Infektionen angegangen, so daß eine befriedigende Wirkung nicht erzielt werden konnte; trotzdem war eine Wirkung besonders des Kupfermittels unverkennbar.

Bei der Spritzung 2 Tage nach dem 1. und 4 Tage nach dem stärksten Sporenflug war der Befall stärker als in der Parzelle II. Die 1. Spritzung hatte hier schon ebenso wie in der Parzelle I ihre Wirkung verfehlt. Die 2. Spritzung war zu spät. Untersuchungen von Primärblättern ergaben, daß der Befall am 30. April schon erheblich, wenn auch makroskopisch nicht sichtbar, war. Die Feststellung von Babel, daß durch Behandlung mit Kupfermitteln der Befall sichtbar gemacht wird, und daß ein „Ausbrennen“ der Fusicladiumflecken stattfindet, konnten wir nicht bestätigen. Wenn das Myzel bereits im Blatt wucherte, konnte durch Spritzungen mit Kupferkalkbrühe keine Bekämpfung des Fusicladiums erreicht werden. Auch Hamilton hat bereits darauf hingewiesen, daß die Wirkung der Kupfermittel nach der Infektion schnell abnimmt.

Einen guten Erfolg erzielten wir durch die dreimalige Bespritzung vor allem mit Kupferkalkbrühe, und zwar am 14., 20. und 26. April. Die Blätter der so behandelten Bäume zeigten den ganzen Sommer über eine gesunde kräftige Farbe. Während die Bäume der übrigen behandelten und der unbehandelten Parzellen schon Mitte Juni das Laub teilweise abstießen, verloren

die dreimal gespritzten Bäume während des Sommers kaum ein Blatt. Nur vereinzelt konnten an den Blättern dieser Bäume Infektionen nachgewiesen werden. Da die 1. Spritzung vor dem 1. stärkeren, die 2. vor und die 3. während des stärksten Sporenfluges vorgenommen wurden, waren die Blätter während der Zeit, in der eine Infektion durch die Askosporen erfolgen konnte, von dem Fungizid bedeckt.

Tabelle 13. Stärke des Blattbefalls 1935.

Parzelle	Blattbefall am	Kaiser Wilhelm	Boskoop	Prinzenapfel	Charlamowsky	Landsberger Renette	Hammerstein	Baumanns Renette	Weißer Klarapfel	Cox Orange
I Cu	22. 5.	2,0	1	0	0,3	0,8	0,8	0,2	0	0,3
	13. 6.	3,5	3,8	2,5	3,5	2,5	3,5	3	1,5	1,8
	2. 8.	3,5	4,5	2,5	5	4	3,8	4	1,5	4
I S	22. 5.	2,5	1,5	0	0	2,5	1	0,3	0	0,4
	13. 6.	3,8	4	2,5	3,5	3	3,5	3,5	1,5	2
	2. 8.	4	4,5	2,8	5	4	3,8	4,5	1,5	4
II Cu	22. 5.	0,1	—	0	0,1	—	0,6	0,1	0	0,3
	13. 6.	0	—	1,5	3	3,5	2,5	2	0,8	2,5
	2. 8.	0	—	1,5	3,5	3,5	2,5	2	0,8	3
II S	22. 5.	0,2	—	—	0,1	0,5	—	0,1	0	0,3
	13. 6.	2,8	—	—	3.5	3,5	—	2	0,8	2,8
	2. 8.	3	—	—	4,5	—	—	3	0,8	4
III Cu	22. 5.	0	1	0	—	0,8	0,1	0	0,1	0
	12. 6.	1,3	3	1,5	—	3,8	2,5	3	0,8	2,5
	2. 8.	2,8	3,8	2	—	4	2,5	3,5	0,8	3,5
III S	22. 5.	0,5	1	0	0	0,8	0,1	0	0	0,3
	12. 6.	1,5	3,5	2,5	2	4,5	2,8	3,2	2	2,5
	2. 8.	3,5	4	3	2,8	5	2,8	4	2	4
IV Cu	22. 5.	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	13. 6.	0,1	0,1	0	0	0,3	0,2	0	0	0
	2. 8.	0,1	0,1	0	0	0,3	0.2	0	0	0
IV S	22. 5.	0	0,3	0	—	0,8	0	0	0	0
	13. 6.	0,2	0,5	0,3	—	1,5	0,7	0,1	0,4	0,8
	2. 8.	0,2	0,5	0,3	—	2	0,7	1	0,4	2
Unbehandelt	22. 5.	0,5	2,5	0	0,5	1	1	0,3	0,1	0,4
	13. 6.	3,8	3,8	2,5	4	3,5	3,5	4	1,5	2,5
	2. 8.	3	5	2,5	5	4	4	4	1.5	4

Die diesjährigen Bekämpfungsversuche haben also wieder gezeigt, daß es durchaus möglich ist, durch Beobachtung des Sporenfluges die Bekämpfung sicherer zu gestalten. Dabei ist es besonders bemerkenswert, daß ein recht befriedigender Erfolg durch 3 Spritzungen vor der Blüte erzielt werden konnte. Das ist aus dem Grunde von besonderer Bedeutung, weil man vor der Blüte in den meisten Fällen ohne Bedenken für die Spritzungen kupferhaltige Mittel verwenden kann, die eine wesentlich bessere fungizide Wirkung haben als schwefelhaltige Mittel, bei Anwendung nach der Blüte aber vielfach starke Verbrennungen hervorrufen. Durch weitere Versuche muß aber noch festgestellt werden, wie lange vor bzw. nach einem Sporenflug die Bekämpfung vorzunehmen ist, um eine befriedigende Wirkung zu erreichen. Durch diese Feststellungen wird man wahrscheinlich auch dahin kommen,

daß die Zahl der Spritzungen weiter verringert werden kann. Allerdings ist kaum anzunehmen, daß sich durch eine Spritzung mit einer konzentrierteren Kupferkalkbrühe, wie Osterwalder versucht hat, befriedigende Erfolge erzielen lassen, da wir sowohl 1934 wie 1935 feststellen konnten, daß nicht nur durch einen Askosporenflug, sondern durch mehrere, Infektionen hervorgerufen werden. Außerdem ist zu bedenken, daß im Frühjahr infolge des schnellen Wachsens bei einer frühzeitigen Spritzung immer wieder neue Blattflächen vorhanden sind, die nicht mit den Fungiziden bedeckt sind.

Andererseits können wir uns der Ansicht von Küthe, daß die Vorblütenspritzung unter gewissen Bedingungen eingespart werden könne, auf Grund unserer Ergebnisse in den Jahren 1934 und 1935 nicht anschließen. Seine Annahme, daß durch die Spritzung während der Inkubationszeit noch eine Bekämpfung möglich sei, ist in keiner Weise bewiesen. Daß seine Spritzung nach der Blüte gewissen Erfolg hatte, läßt sich ohne weiteres durch die Beobachtung des Sporenfluges erklären, weil bei unseren Versuchen noch am 7. Mai eine beträchtliche Zahl von Sporen in der Luft festgestellt wurde, die einen erheblichen Befall verursachte. Aus den Versuchen der Jahre 1934/35 geht eines sehr deutlich hervor, nämlich, daß die bisherige Methode, die Spritzzeiten nach dem Entwicklungszustand des Baumes festzulegen, keinen sicheren Erfolg verspricht. Daß man mit der Spritzung nach erfolgter Infektion noch eine Wirkung erzielen kann, ist durchaus erklärlich. Vor allem wird diese Spritzung dann besonders erfolgreich sein, wenn sie unmittelbar vor dem Auftreten der Konidienrasen vorgenommen wird, da dann ein großer Teil der Konidien abgetötet wird und somit keine weitere Infektion eintreten kann. Aus diesem Grunde hat Gloyer vorgeschrieben, die Spritzung stets 10—12 Tage nach der Infektion durchzuführen. Wir halten es aber für besser, eine Infektion überhaupt zu verhindern dadurch, daß man die Askosporen abtötet, zumal man, wie schon betont, dafür in den meisten Fällen die fungizid bessere Kupferkalkbrühe verwenden kann.

Zusammenfassung.

Bei der Beobachtung der Perithezienentwicklung konnte festgestellt werden, daß sich die Perithezien bis Anfang Januar nur sehr wenig vergrößern. Die Entwicklung wird durch höhere Temperaturen nicht beschleunigt, sondern sogar gehemmt. Für die Reifung jedoch sind höhere Temperaturen erforderlich. Das Ausschleudern der Askosporen geht im Frühjahr besonders dann vor sich, wenn nach einigen wärmeren Tagen Regen niedergeht. Die ersten Askosporen wurden im Freiland auf abgefallenen Blättern am 2. April gefunden. Die Sporenaussaaten waren am 26. Mai im wesentlichen beendet. Das Ausschleudern der Sporen wurde auch wieder nur nach Niederschlägen beobachtet, dabei war nicht deren Menge, sondern ihre Häufigkeit ausschlaggebend. Die Entwicklung der Perithezien war am 18. Febr. abgeschlossen. Blätter, die zu diesem Zeitpunkt in Temperaturen von 12 und 18° C gebracht wurden, schleuderten bereits nach 13 Tagen Askosporen.

Infektionsversuche wurden mit Askosporen, Konidien und Myzel vorgenommen. Die günstigste Temperatur für die Infektion lag bei 19° C. Die Inkubationszeit betrug bei Infektion mit Askosporen 9—14 Tage, bei der mit Konidien 8—10 Tage. Infektionen gingen auch bei niedrigen Temperaturen an, die Krankheit kam aber erst zum Durchbruch, wenn die Bäumchen bzw. Blätter in höhere Temperaturen gebracht wurden.

Bäumchen, die vor der Infektion dunkel gehalten wurden, zeigten stärkeren Befall als solche, die im Licht gestanden hatten.

Mit Myzel konnten Infektionen an abgeschnittenen Blättern erzielt werden. Zur Konidienbildung kam es jedoch nicht. Die günstigste Temperatur für das Wachstum im Blatt war etwa 19° C. Untersuchungen an verschieden alten Blättern zeigten, daß jüngere Blätter stärker als ältere von Fusicladium befallen wurden, daß aber ganz junge nicht am anfälligsten waren.

Im Dunkeln wuchs Fusicladium in abgeschnittenen Blättern besser als im Licht.

Bei Temperaturen unter 10° C wurde bei Infektionen mit Konidien und Myzel „Appressorium"-Bildung beobachtet. Über 10° C wurden Appressorien nur dann gebildet, wenn die Hyphe durch irgendwelche äußere Einflüsse am Eindringen gehindert wurde.

Bei einigen Sämlingen wurde latenter Befall festgestellt, der das Wachstum der Bäumchen erheblich störte.

Die ersten Askosporen 1935 in der Luft wurden am 10. April gefangen, die letzten am 18. Mai.

Bei der Bekämpfung wurde durch 3maliges Spritzen vor der Blüte, und zwar vor dem 1. stärkeren, vor und während des stärksten Sporenfluges ein guter Erfolg mit 1 proz. Kupferkalkbrühe erzielt.

Der Forschungsgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft, die uns für die Untersuchungen Mittel zur Verfügung stellte, danken wir für die Unterstützung bestens.

Literaturverzeichnis.

Aderhold, R., Die Fusicladien unserer Obstbäume. I. Teil. (Landw. Jahrb. Bd. 25. 1896. S. 875—914.) II. Teil. (Ebenda. Bd. 29. 1900. S. 541—588.) — Babel, A., Schorfbekämpfung nach neuen Beobachtungen. (Ztschr. f. Pflanzenkrankh. u. Pflanzenschutz. Bd. 43. 1933. S. 498—502.) — Clinton, G. P., Apple scab. (Illinois Agric. Exp. Stat. Bull. 67. 1901. p. 109—156.) — Frey, C. N., and Keitt, G. W., Studies of spore dissemination of Venturia inaequalis in relation to seasonal development of apple scab. (Journ. of Agric. Res. Vol. 30. 1925. p. 529—540.) — Gloyer, W. O., Evaluation of applications of lime-sulfur for the control of apple scab. (New York State Agric. Exp. Stat. Bull. 624. 1933. 39 p.) — Hamilton, I. M., Studies of the fungicidal action of certain dusts and sprays in the control of apple scab. (Phytop. Vol. 21. 1931. p. 445—523.) — Holz, W., Eine Methode zur Feststellung des Befalls mit Fusicladium dendriticum vor dem Ausbruch der Schorfkrankheit bei Pirus malus. (Zentralbl. f. Bakt., Abt. II. Bd. 92. 1935. S. 459—461.) — Keitt, G. W., and Jones, L. K., Studies of the epidemiology and control of apple scab. (Wisconsin Agric. Exp. Stat. Res. Bull. 73. 1936. 104 p.) — Küthe, K., Zur Infektion und Kultur des Apfelschorfes, Venturia inaequalis (Cooke) Aderhold. (Gartenbauwissensch. Bd. 9. 1935. S. 405—420.) — Osterwalder, A., Winterspritzung mit 6 proz. Bordeauxbrühe gegen Schorf- und Weißfleckenkrankheit. (Schweiz. Ztschr. f. Obst- u. Weinbau. Bd. 44. 1935. S. 81—86.) — Wallace, E., Scab disease of apple. (Cornell Univ. Agric. Exp. Stat. Bull. 335. 1913. p. 545—624.) — Wiesmann, R., Untersuchungen über Apfel- und Birnenschorfpilz Fusicladium dendriticum Wallr. Fckl. und Fusicladium pirinum Lib. Fckl. sowie die Schorfanfälligkeit einzelner Apfel- und Birnensorten. (Landw. Jahrb. d. Schweiz. Bd. 35. 1931. S. 109—157.) — Wiesmann, R., Untersuchungen über die Überwinterung des Apfelschorfpilzes im toten Blatt sowie die Ausbreitung der Sommersporen des Apfelschorfpilzes. (Landw. Jahrb. d. Schweiz. Bd. 46. 1932. S. 619—679.) — Wiltshire, S. P., Infection and immunity studies on the apple and pear scab fungi (Venturia inaequalis). (Ann. Appl. Biol. Vol. 1. 1915. p. 335—350.) — Winkelmann, A. und Holz, W., Beiträge zur Biologie und Bekämpfung des Apfelschorfes (Fusicladium dendriticum [Wallr.] Fckl.). (Zentralbl. f. Bakt., Abt. II. Bd. 92. 1935. S. 47—61.)

Pseudomonas nivalis n. sp., ein Beitrag zur Kenntnis des Genus Serratia Bizio.

[Aus dem Institut für biochemische Technologie, Sekt. Mikrobiologie der Technischen Hochschule Wien.]

Von **Armin von Szilvinyi.**

Bekanntlich richtete sich die Aufmerksamkeit der Forschung schon frühzeitig auf die durch ihre Farbe so auffallenden roten Mikroorganismen, besonders bei massenhaftem Auftreten derselben. Gelegentlich eines solchen in der Provinz Padua 1823 wurde ja auch von Bizio die Gattung Serratia aufgestellt; er verstand darunter rote, die Verfärbung von Lebensmitteln hervorrufende Pilze. Derselbe Organismus oder zumindest sehr ähnliche wurden dann unter den verschiedensten Namen beschrieben und untersucht (Buchanan 1925). Der alte Name Serratia wurde erst wieder 1913 von Vuillemin in Vorschlag gebracht, allerdings in einem neuen, viel umfassenderen Sinne; er verstand darunter alle nicht sporenbildenden, peritrich begeißelten Stäbchen, gleichgültig welcher Färbung. 1918 wurde auf Initiative Buchanans vom Am. Committee der Name Serratia wieder aufgenommen. Die Genusdiagnose lautet (Bergey 1930): „Kleine, aerobe Stäbchen, auf Agar oder Gelatine rotes oder rosa Pigment bildend." Die Unterteilung erfolgte nach den Untersuchungen von Breed und Breed (1927), sowie von Breed und Pederson (1928). Nach diesen zerfällt das Genus in S. im engeren Sinne in kleine, aerobe, bewegliche peritrich begeißelte Stämme, die den charakteristischen Farbstoff Prodigiosin bilden und im weiteren Sinne werden alle Arten kleiner aerober Stäbchen hinzugerechnet, welche rotes oder rosa Pigment bilden ohne Rücksicht auf ihre sonstigen Eigenschaften.

Gelegentlich der Untersuchung von Bodenproben vom Gipfel des Schneeberges in Niederösterreich (2075 m), die am Rande eines Schneefeldes entnommen worden waren, konnte auf Glukose-Pepton-Agar (Janke, Sekera und Szilvinyi 1934) ein rotes Bakterium isoliert werden, das durch die Anpassung an die an seinem Standort herrschenden tiefen Temperaturen interessant erscheint, sein Wachstumsoptimum liegt bei den für Bakterien ungewöhnlichen Temperaturen von 0—11° C.

Bei höheren Temperaturen ist das Wachstum geschwächt und wird die Farbstoffproduktion eingestellt.

Beschreibung.

Vegetative Zellen auf Glukose-Pepton-Agar. p_H 5,6—6. Temperatur: 4° C. Alter: 14 Tage. Kurzstäbchen, einzeln und paarweise.

Länge 50.

$$M = 2{,}39 \pm 0{,}0135\ \mu.$$
$$s = \pm 0{,}7914\ \mu.$$
$$Mo = 2{,}42\ \mu.$$

Breite 0,4—1 μ (bezüglich der Berechnung siehe Janke, 1928).
Extremwerte der Länge 4,84 und 1,25 μ.
Enden der Zelle abgerundet.

Keine Sporenbildung.

In Brühe und auf Agar beweglich bis zum ungefähr 14. Tag.

Begeißelung: 1 Geißel polar.

Unregelmäßige Formen nicht vorhanden.

G r a m färbung (Originalvorschrift) in der Jugend positiv, dann negativ.

Nährbrühe: 7 Tage bei 20° bebrütet. Kein Oberflächenwachstum. Mäßig getrübt. Reichlicher, weißlicher Bodensatz. Flüssigkeit fadenziehend.

Milch, 7 Tage bei 20°: Flüssigkeit schwach rosa mit rosaroten oder roten Bakterienklumpen. pH unverändert, keine Peptisation oder Koagulation.

Nähragar, 7 Tage bei 20°: Schwaches, ausgebreitetes Wachstum. Glänzende, glatte Oberfläche. Durchscheinend, ganz schwach rosa, butterartig. Rand ausgebuchtet. Geruch mitunter nach Aminen.

Gelatine Stich: Kein Wachstum.

Glukose-Pepton-Gelatine, 7 Tage bei 10°: Wachstum an der Oberfläche besser. Verflüssigung napfförmig.

Traubenzucker-Agar, 7 Tage bei 20° C: Üppiges Wachstum. Ausgebreitet, flach, glänzend, glatt, durchscheinend. Butterartige Konsistenz. Rand ausgebuchtet. Färbung schwach rosa.

Kartoffel: Kein Wachstum.

Glukose-Pepton-Agar, 4 Wochen bei 0°: Starkes, ausgebreitetes, flaches Wachstum. Glänzende, rauhe, undurchsichtige Oberfläche. Bordeauxrot mit fuchsinartigem Schimmer. Geruch nach Aminen. Brüchig-trockene Konsistenz. Nährboden schwach rot verfärbt. Der vorliegende Organismus war ursprünglich für eine den tiefen Standortstemperaturen angepaßte S. m a r c e s c e n s gehalten worden, doch sprach dagegen die polare Begeißelung. Untersuchung weiterer, zu S e r r a t i a gerechneter Arten wie S. i n d i c a K., S. p l y m o u t h i c a Berg., S. l a c t o r u b e f a c i e n s Berg., S. h a v a n i e n s i s und verschiedener farbiger und farblos gewordener m a r c e s c e n s - Stämme[1]) zeigte, daß bis auf diese und S. l a c t o r u b e f a c i e n s (nach der Literatur) sämtliche genannten Arten lophotrich begeißelt waren. Es wurden daher bis jetzt zur Gattung S e r r a t i a Arten gezählt, die bei gleicher oder ähnlicher Färbung verschiedene Begeißelungstypen aufweisen. Nun ist aber die systematische Wertigkeit der beiden Eigenschaften Begeißelung und Färbung durchaus nicht die gleiche; in Anbetracht der starken Variabilität der Färbung wäre ja überhaupt zu erwägen, ob diese als systematisches Merkmal herangezogen werden soll. Dagegen ist bis jetzt kein Fall bekannt, daß bei demselben Organismus verschiedene Begeißelungstypen auftreten. Es ist daher wohl zweckmäßiger, diese Organismen ohne Rücksicht auf die Färbung zur Gattung P s e u d o m o n a s im Sinne M i g u l a s zu rechnen und bei S e r r a t i a bloß die peritrich begeißelten Formen, also m a r c e s c e n s und l a c t o - r u b e f a c i e n s zu belassen[2]).

Nachdem die beschriebene Art sowohl von S e r r a t i a als von P s e u d o m o n a s - Arten teils durch ihre Begeißelung, teils durch ihr morphologisches und kulturelles Verhalten genügend unterschieden ist, erscheint es gerechtfertigt, sie als P s e u d o m o n a s n i v a l i s n. sp. zu bezeichnen.

[1]) Dem K r a l schen Museum (Prof. P r i b r a m) Wien sei auch an dieser Stelle für die Überlassung der Stämme bestens gedankt.

[2]) Von P s e u d o m o n a s in diesem Sinne ist Ps. im Sinne des Am. Comm. zu unterscheiden, welches nur fluoreszierende Arten umfaßt.

Zusammenfassung.

Vom Rande eines alpinen Schneefeldes konnte eine kryophile, rote Pseudomonas-Art, Ps. nivalis n. sp. isoliert werden. Eine Durcharbeitung des Genus Serratia Bizio läßt es zweckmäßig erscheinen, zu diesem nur die peritrich begeißelten Arten zu rechnen und die lophotrich begeißelten ohne Rücksicht auf die Färbung Pseudomonas Migula beizuordnen.

Literatur.

Buchanan, General Systematic Bacteriology. Baltimore 1925. — Bergey, Determinative Bacteriology. London 1930. — Breed u. Breed, Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 71. 1927. S. 435—440. — Breed u. Pederson, Journ. Bact. Vol. 16. 1928. p. 163. — Janke, Sekera und Szilvinyi, Arch. f. Mikrobiol. Bd. 5. 1934. S. 223—245. — Janke, Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 74. 1928. S. 26—44.

Beitrag zur Lebensgeschichte der Spirochaeten in natürlichen Gewässern unter besonderer Berücksichtigung dänischer Verhältnisse.

[Aus dem Staatlichen Seruminstitut in Kopenhagen. (Direktor Dr. Madsen.)]

Von Dr. **Margarete Zuelzer**-Berlin.

Seit der Entdeckung des Erregers der Weilschen Krankheit mehren sich die Beobachtungen über das Auftreten dieser Krankheit auch in Gegenden, wo sie früher nicht erkannt worden war. Bisher machte Dänemark hiervon eine Ausnahme; denn während die Weilsche Krankheit in England, in Frankreich, im angrenzenden Deutschland und besonders Holland in immer zunehmendem Maße zur Beobachtung gelangte, wurden in Dänemark in den letzten 40 Jahren im ganzen nur vier sichere Fälle von Weilscher Krankheit diagnostiziert. Es war meine Aufgabe, die Ursachen dafür zu erforschen. Waren Faktoren vorhanden, die die Verbreitung der Krankheit verhindern, oder war sie vorhanden, aber nicht erkannt worden?

Überall erfolgen die weitaus meisten Weil-Infektionen im Wasser. Epidemien von Weilscher Krankheit treten nur in Gegenden auf, in deren Gewässern Weil-Spirochäten leben können, und die dadurch zur Verbreitung und Übertragung der Spirochäten geeignet sind. Nur diejenigen Gewässer, in denen die allgemein als harmlos angesehene Spirochaeta biflexa Wollbach u. Binger syn. Spirochaeta pseudoicterogenes Uhlenhuth u. Zuelzer leben kann, bieten auch der primär pathogenen Spirochaeta syn. Leptospira icterohaemorrhagiae Inada syn. Spirochaeta icterogenes Uhlenhuth Lebensmöglichkeiten. Deshalb ist die Biologie der Wasser-Spirochäten für die Epidemiologie der Weilschen Krankheit von grundlegender Bedeutung.

Als Wasserspirochäten sind in diesem Zusammenhang nur die Spirochäten vom icterogenes-Typ zu verstehen. Diese Spirochäten stimmen in Form, Struktur und Bewegungsart mit der pathogenen Spirochaeta icterohaemorrhagiae syn. icterogenes überein.

Sie zeigen die Kleiderbügelform, die feinen primären Windungen und die charakteristischen Rotationsbewegungen. Im Wasser finden sich neben den typischen Formen häufig dickere, loser gewundene oder auch sehr kleine, feine, äußerst zarte Organismen. Auch sind bei manchen Exemplaren die Enden nicht so scharf knickartig abgesetzt, sondern mehr halbkreisförmig abgebogen (Zuelzer 1925). Atypische Formen kommen auch bei den pathogenen Spirochäten vor, jedoch ist die Variationsbreite der Wasserformen größer. Bei den Spirochäten ist bekanntlich Form, Größe und Teilungsintensität in gewissem Grade abhängig vom Medium, in dem sie leben. Dementsprechend kommt den im freien Wasser stets wechselnden Ernährungsbedingungen wohl auch ein Einfluß auf die Morphologie der Spirochäten zu (s. Sardjito 1933, Formveränderung von Rattenspirochäten in Wasser). Aber in der freien Natur leben verschiedene Rassen von Spirochäten nebeneinander, deren Formen durch losere Windungen, längeres Mittelteil im Verhältnis zu den Enden, Länge der ganzen Spirochäta usw. variieren. Auch am gleichen Standort gibt es verschiedene Typen von Wasserspirochäten, die untereinander morphologisch gleich sind oder nur geringe Unterschiede aufweisen können; serologisch aber sind sie meist völlig voneinander verschieden.

Zunächst die Frage nach dem Standort der Spirochäten im Wasser: Die Spirochäten können sowohl im Plankton leben (nur kulturell nachweisbar), als auch am Grunde der Gewässer, auf Schlamm sowie in der Uferregion auf Kraut, Schilf oder sonstigen Unterlagen. Meist hat der Standort Einfluß auf das mengenmäßige Vorhandensein der Spirochäten.

Bei früheren Spirochätenuntersuchungen (Zuelzer 25—27), als ich nur durch direkte mikroskopische Beobachtungen, häufig nach Anreicherung (z. B. Weckglasmethode) im Wasser Spirochäten nachzuweisen mich bemühte, konnte ich Spirochäten nur da finden, wo sie sich auf einer Unterlage angereichert, auf Schlamm, organischen Filzen usw. angesiedelt hatten und dort leicht abgefangen werden konnten, z. B. in fast allen Oberflächenwassern in der Umgegend von Berlin, in der Berliner Wasserleitung, in Sumatra. Aus diesen Befunden glaubte ich früher auf ein Kontaktbedürfnis in der Lebensweise der Spirochäten schließen zu dürfen, auf das auch von anderer Seite (Uhlenhuth, Kunstein u. a.) hingewiesen worden ist. Aber sowohl auf Grund meiner Studien über elektrische Ladung der Spirochäten (Kroß und Zuelzer 32) als auch auf Grund von Züchtungsversuchen aus klaren Gewässern (s. Abt. I, 1936, Bd. 136, S. 196) habe ich mich davon überzeugt, daß Spirochäten auch im Plankton leben können.

Die Ökologie der Spirochäten ist ein noch wenig bekanntes Gebiet. Leben und Ausbreitung der Spirochäten im Wasser dürfte von den verschiedensten Faktoren abhängig sein. Einer dieser Faktoren ist für Spirochaeta icterogenes bereits gefunden. Entsprechend ihrem optimalen Wachstum in Kulturen zeigt sie in Wässern bestes Wachstum, deren p_H zwischen 7 und 8 liegt. Dagegen ist sie bei niedrigerem p_H als 6,6—6,8 nicht anzutreffen. Elektrophoreseversuche haben ergeben, daß diese Lebensfähigkeit der Spirochäten von ihrem Ladungsgrad und dieser wieder von den H-Ionen des sie umgebenden Mediums abhängt.

Alle lebenden Spirochäten sind negativ geladen. Wie durch Säurezusatz zu gut gewachsenen Kulturen festgestellt werden konnte, erstreckt sich ihr Lebensbereich von p_H 8,6 bis etwa 6. In der Gegend von p_H 5, bei etwa p_H 4,7, liegt ihr isoelektrischer Punkt. In dieser Zone sind die Spirochäten

ungeladen. Bei der Entladung, etwa bei p_H 6, werden die Spirochäten unbeweglich, starr. Dieser Vorgang ist eine Zeitlang reversibel; werden solche Spirochäten in ein Medium von höherem p_H, etwa p_H 7 zurückgebracht, so können sie wieder beweglich werden. Bei tieferem p_H wie p_H 6 jedoch beginnen sie abzusterben. Entladene Spirochäten sind bei p_H 5 tot. Betonen möchte ich, daß zwischen hochvirulenten Spirochäten aus Mensch und Tier und der größtenteils als harmloser Saprophyt angesehenen Wasserspirochäte Spirochaeta pseudoicterogenes in bezug auf Ladung und Lebensfähigkeit keine Unterschiede bestehen. Nur negativ geladene Spirochäten sind im Wasser suspendiert; entladene flocken aus. Erst unter diesem Gesichtspunkt werden viele Erfahrungen über Beziehungen zwischen der Reaktion der Gewässer und der Verbreitung der Weilschen Krankheit verständlich. Innerhalb der gegebenen Grenzen verhalten sich die einzelnen Spirochätenstämme verschieden empfindlich gegenüber Veränderung des p_H des umgebenden Mediums. Die größte Variationsbreite zeigen im allgemeinen die Wasserstämme. Die Menschenstämme sind gegen Erhöhung der Alkalität empfindlicher als die Wasserstämme, und die serologisch und in pathogener Hinsicht mit Menschenstämmen übereinstimmenden Rattenstämme zeigen in bezug auf schwächere Empfindlichkeit gegen Alkalitätserhöhung mehr Übereinstimmung mit Wasserstämmen (Kroß und Zuelzer 32).

Unter Umständen konnte es vielleicht in diesem Zusammenhange beachtenswert sein, daß die Spirochäten auch durch ihre eigene Lebenstätigkeit das p_H des Mediums, in dem sie leben, zu verandern imstande sind, eine Eigenschaft, die bisher nur während der Entwicklung von Reinkulturen in Serumwasser verfolgt worden ist (Sardjito und Zuelzer, Kross nnd Zuelzer, Thiry).

Die verschiedenen Stämme verändern während ihrer Entwicklung das p_H des umgebenden Mediums verschieden stark, sowohl nach der sauren wie nach der alkalischen Seite hin.

Übrigens bieten nicht alle Naturgewässer, auch bei an sich geeignetem p_H, ähnlich wie das auch für eine Reihe anderer Organismen bekannt ist, den Spirochäten gleichmäßig gute Lebensmöglichkeit (Sardjito; Ruys zit. nach Schüffner 34). Darin liegt ein epidemiologisch wichtiges Problem, auf dessen Bedeutung für Holland Schüffner (34) besonders hingewiesen hat. Außer dem p_H kommt vermutlich dem Kalkgehalt, dem Säurebindungsvermögen, der Sauerstoffmenge des Wassers, sowie der Sauerstoffzehrung des Schlammes Bedeutung zu, die der näheren Erforschung bedarf.

Die Spirochäten können in Gewässern von verschiedenster chemischer Zusammensetzung leben. Aber sehr häufig ahnt man ihre Anwesenheit nicht, weil sie nur ganz vereinzelt vorhanden und bei direkter mikroskopischer Untersuchung des Wassers oder Schlammes überhaupt nicht zu ermitteln sind. Sie können im Wasser fast katharob, sicher oligotroph (siehe Kolkwitz 35) leben und sich in Gewässern vermehren, die nur so geringe Spuren organischer Substanz enthalten, daß andere chlorophyllfreie Organismen darin nur in sehr geringer Menge vorkommen. In den verschiedensten hygienisch ganz einwandfreien Wasserleitungen sind immer wieder vereinzelte Spirochäten nachgewiesen worden. An Stellen mit kleinen Verunreinigungen dagegen, wie an wenig benutzten Wasserhähnen, in Wasserschläuchen, zwischen organischen Filzen, sammeln sie sich an und sind dort dann direkt mikroskopisch nachweisbar. Mit Vorliebe pflegen sich die Spirochäten in organisch verunreinigtem Wasser anzusiedeln und oft reichlich zu ver-

mehren, wenn es sich bei den Verunreinigungen um Zersetzungsprodukte vorwiegend pflanzlicher Herkunft handelt, während sie in Wässern mit starker stinkender Eiweisfäulnis tierischer Herkunft meist absterben. In eutrophen Gewässern, hier manchmal an dystrophen Stellen, sind die Spirochäten in der freien Natur unter natürlichen Bedingungen am häufigsten und in größten Mengen anzutreffen. Wird bei der Zerstörung von Eiweiß aus sich zersetzenden organischen Stoffen im Wasser H_2S gebildet, so bevorzugen die Spirochäten solche Stellen. Also sogar H_2S-Gehalt und eine in stehendem Wasser dadurch bedingte Sauerstoffarmut des Wassers schädigt die Spirochäten keineswegs. Die Variationsbreite ihrer Lebensmöglichkeiten ist demnach eine recht erhebliche.

Ebenso groß ist auch die Variationsbreite der Spirochäten in bezug auf Temperaturen, denen gegenüber sie sich recht indifferent verhalten. Denn die Spirochäten können sowohl in heißen Quellen von 40—45° leben (Zuelzer isolierte einen Stamm aus Tjipanas Mitteljava, bei 45° C), als auch das Ausfrieren vertragen. Virulente Weil-Spirochäten aus dem Menschen waren in Kulturen, die gefroren waren, nach dem Auftauen lebend und verimpfbar. Die Virulenz ging bei — 4° verloren, aber lebend blieben sie noch bei — 18° (Uhlenhuth und Zuelzer 21). In der freien Natur wurden die Spirochäten lebend unter dem Eis gefunden (Fauler See bei Berlin, Kolkwitz, Zuelzer). Diese Resistenz gegenüber Temperaturen, ihr Vermögen, sich auch extremen Temperaturen anzupassen, erklärt die Ausbreitung der Spirochäten über alle Zonen der Erde. Optimale Bedingungen für ihre Vermehrung in der freien Natur finden die Spirochäten in Temperaturen der tropischen Gewässer bei 25—30°.

Neben der Ökologie ist auch die Soziologie, die Lebensgemeinschaft, in der die Spirochäten in der freien Natur leben und die gegenseitige Beeinflussung der Organismen innerhalb der Biozönosen, von größter, vielleicht grundlegender Bedeutung. Wo in der freien Natur im Wasser größere Mengen von Spirochäten leben, ist es charakteristisch, daß in ihren Lebensgemeinschaften mengenmäßig Schizomyceten und Schizophyceen überwiegen. Bakterien, Stäbchen und Kokken, sind stets Begleiter von Spirochäten. Ferner können vergesellschaftet mit Spirochäten auftreten: Beggiatoa, Achromatium, Thiospira und Thiospirillum, Spirillum undula und minor, Chloronium mirabile usw. Von Schizophyceae sind besonders die Oszillatorien limosa, chlorina usw. sehr häufig vergesellschaftet mit Spirochäten.

Von Diatomaceae: Navicula und Nitzschia.

Protococcales: Chlamydomonaden, Chlorella, Chlorococcus.

Spirochaeta: Die verschiedenen Wasserspirochäten (plicatilis, stenostrepta usw.)

Mastigophora: Euglenales, Oikomonas, Monas, Bodonenschwärme, Cryptomonas, Polytoma uvella.

Rhizopoda: Amoeba limax (besonders häufig), Arcella, Difflugia, Euglypha, Trinema. In Dänemark häufig: Raphidiophrys.

Ciliaten: Paramaecium, Cyclidium, Coleps hirtus, Colpidium, Chilodon.

Rotatorien: Rotifer, Callidina.

Wie die angeführten Begleiter erkennen lassen, sind die Spirochäten am häufigsten vergesellschaftet mit α-mesosaproben Organismen.

Meine Beobachtungen über die gegenseitige Beeinflussung der Organismen in den Biozönosen untereinander und auf die Spirochäten, stehen erst im Anfang. Bisher liegen nur sehr wenige Beobachtungen aus diesem Gebiete, das für die Epidemiologie der Weilschen Krankheit von Wichtigkeit sein kann, vor. Denn nur zwischen bestimmt zusammengesetzten Biocoenosen vermehren sich die Spirochäten, zwischen andern können einzelne Exemplare überleben, und wieder von anderen werden die Spirochäten völlig überwuchert und verdrängt. Vielleicht kann sogar nur beim Zusammenleben von bestimmten Spirochätenrassen mit bakteriellen oder anderen Kommensalen die Virulenz der Spirochäten gesteigert werden, ähnlich wie in der Symbiose bei Plaut-Vinzentscher Angina die fusiformen Bazillen und Spirochäten. Zwischen anderen Lebensgemeinschaften wird vielleicht nur die Virulenz geschwächt.

Aus meinen bisherigen, spärlichen Beobachtungen aus diesem weiten Gebiet sei mitgeteilt, daß besonders Vorticella microstoma für die Spirochäten ein gefährlicher Nachbar ist. Von diesem Ziliaten ist bekannt, daß er bei der biologischen Selbstreinigung oft als Bakterienfresser beteiligt ist. Vort. microstoma entwickelte sich häufig beim Stehenlassen von Wasserproben, die auf Spirochaeta icterogenes untersucht werden sollten, sowie nach deren Verimpfung auf Eiagarplatten (s. Zuelzer, Abt. I, Bd. 136, S. 195). Sobald sich Vort. microstoma entwickelte und vermehrte, verschwanden die Spirochäten, die vorher vorhanden gewesen waren. In anderen Kulturen, beimpft mit Wasser der gleichen Herkunft, in denen keine Vort. microstoma gewachsen war, vermehrte sich dagegen Spirochaeta icterogenes. Ob Vort. microstoma ebenso wie Bakterien auch Spirochäten frißt, oder welches sonst die Gründe des Verschwindens der Spirochäten in Gegenwart dieser Vorticella sind, bedarf weiterer Beobachtung.

Im Gegensatz hierzu stehen die Beziehungen von Raphidiophrys und Spirochaeta. In freien Gewässern Dänemarks, besonders in und um Frederiksvaerk, ist dieses in Norddeutschland ± seltene Heliozoon sehr häufig und zwar meist vergesellschaftet mit Spirochäten. Auf Eiagarplatten vermehrte sich Raphidiophrys üppigst zusammen mit den Spirochäten und in solchen Kulturen wurden im Laufe von mehreren Passagen meist die anderen Protozoen verdrängt.

Es ist meine Absicht gewesen, in Mischkulturen von pathogenen und Wasserspirochaeten ganz im einzelnen die Beziehungen der Spirochaeten zu den frei lebenden Wasserorganismen näher zu verfolgen und speziell zu prüfen, in welchen Mikroorganismenzusammensetzungen die pathogenen Spirochaeten überleben und ob sie in bestimmten Biocoenosen ihre Virulenz steigern oder verlieren können.

Leider mußte ich diese Arbeiten aus äußeren Gründen unvollendet abbrechen.

Charakteristisch ist die Biozönose von Wasserspirochäten mit Schwefelbakterien; sie hängt von der Anwesenheit von H_2S ab[1]). Aber während die roten Schwefelbakterien zum Leben im allgemeinen mehr H_2S benötigen wie die Spirochäten vertragen können, und mit weniger O_2 auskommen wie diese[2]), sind die farblosen Schwefelbakterien, die mit geringeren Mengen von H_2O auskommen und mehr O_2 bedürfen, typische Begleiter der Spirochäten

[1]) Dabei denke ich mehr an einen mittleren als an einen extremen Gehalt von H_2S.

[2]) Im allgemeinen werden die roten Schwefelbakterien nicht mit den Spirochaeten vergesellschaftet gefunden.

vom icterogenes-Typ. Besonders häufig ist die Biozönose von Beggiatoa und Spirochaeta: wo auch nur wenige Beggiatoen, vielleicht sogar nur ein Beggiatoafaden zu finden ist, ist sicher auch eine Spirochaeta in der Nähe. In organisch verunreinigten Gewässern, in denen sich zersetzendes Eiweiß zur H_2S-Quelle wird, treten die Spirochäten zum Teil in großen Mengen auf. Wenn am Grunde eines Gewässers Schwefeleisen enthaltender Faulschlamm vorhanden ist, so pflegen sich dort mehr oder weniger dichte, spinnwebartige weiße Schleier von Beggiatoa zu bilden, welche wegen ihres O_2-Bedarfes, den sie aus dem überstehenden Wasser befriedigen, dem Schlamme aufliegen; zwischen diesen Geflechten sammeln sich Spirochäten besonders reichlich an. Beggiatoa bevorzugt stehendes, jedenfalls ruhiges Wasser; die Spirochäten siedeln sich ebenfalls an solchen Stellen an. Pflanzlicher Faulschlamm oder nicht zu stark mit sich zersetzenden Eiweißkörpern tierischer Herkunft belasteter Schlamm hat keine so große Sauerstoffzehrung wie Eiweißfaulschlamm tierischer Herkunft, und kann als typischer Standort für Beggiatoageflechte bezeichnet werden. An solchen Stellen sind die Spirochäten am leichtesten abzufangen und daher in Proben von diesen sogar direkt mikroskopisch nachweisbar. Aber auch über den Schlamm in freien Wassern, auch dann, wenn dieses Wasser arm an organischen Bestandteilen, sauber „oligotroph" ist, können die Spirochäten in oligosaproben Planktonbiozönosen leben.

In natürlichen Schwefelquellen, in Gewässern, deren H_2S nicht durch Eiweißfäulnis gebildet wird, sondern terrestrischen Ursprungs (z. B. Schwefelquelle bei Hannover, Solquelle von Artern), ist, können die Spirochäten in oligotrophem Wasser zwischen oligosaproben Lebensgemeinschaften, in großen Mengen gedeihen. — Aber im allgemeinen sind bei oligosaprober Lebensweise die Spirochäten zwar weit verbreitet, doch mengenmäßig — abgesehen von den natürlichen Schwefelquellen — nur recht vereinzelt, bei mesosaprober dagegen meist in größerer Anzahl anzutreffen. Wenn Kunstein aus verunreinigten Gewässern mehr positive Resultate auf Spirochätenanwesenheit erzielte wie aus sauberem Wasser, in dem die Spirochäten zwar vorhanden, aber spärlicher und daher schwieriger nachzuweisen sind, so dürfte der Grund hierfür vielleicht in der Untersuchungsmethode (Stuhlnährboden!) liegen.

Spirochaeta pseudoicterogenes marina Zuelzer lebt unter den gleichen soziologischen wie ökologischen Bedingungen wie die Süßwasserspirochäten.

Die größten Mengen von Spirochäten, die ich je in der freien Natur zu beobachten Gelegenheit hatte, sah ich oligosaprob lebend im Solgraben von Artern, dessen Wasser ausgezeichnet ist durch sehr geringen Gehalt an organischen Substanzen und beträchtlichem an Sulfaten. Die Quelle weist einen um 1% höheren Salzgehalt auf als das Meerwasser und besitzt infolge ihres Reichtums an Kalk ein hohes Säurebildungsvermögen, ähnlich wie Fundplätze in der Mangrove, z. B. im Slingerlandsee Westjavas (Sardjito und Zuelzer). An Stellen des Grabens, an denen die Strömung des Wassers langsam ist, waren auf der Oberfläche des Schlammes weißliche Geflechte von Beggiatoa mirabilis und alba, zwischen denen die Spirochäten in sehr großen Mengen lebten. Beggiatoa ernährt sich nach der üblichen Auffassung rein mineralisch

„autotroph"; die Spirochäten dagegen brauchen zum Leben organische Stoffe, die sie naturgemäß osmotisch aufnehmen. Die Spirochäten benötigen nicht nur keinen H_2S, sondern durch dessen Anwesenheit wird sogar der für das Leben der Spirochäten notwendige O_2 verringert. Wenn die Spirochäten, obwohl sie H_2S nicht zum Leben brauchen, häufig und in großen Mengen gerade in der Schwefelwasserstoffzone zu finden sind und dort sowohl oligosaprob wie mesosaprob leben können, so ist der Grund wohl darin zu finden, daß sie H_2S besser ertragen können wie andere Organismen, deren Konkurrenz an solchen Standorten dann keine hindernde Rolle bei der Vermehrung der Spirochäten spielt, während die Spirochäten, besonders in nährstoffreichen Zonen, oft von anderen Organismen, hauptsächlich von Bakterien, verdrängt werden.

Infektionen an Weilscher Krankheit aus Meerwasser sind bisher nicht bekannt geworden, wohl aber aus Brackwasser.

Um die epidemiologisch wichtige Frage prüfen zu können, ob pathogene Spirochaeten im Meerwasser zu leben imstande sind, hatte ich begonnen, zuerst Süßwasserspirochaeten, später auch Rattenspirochaeten zunächst aus Reinkulturen an Meerwasserkonzentration zu gewöhnen. Da ich diese Versuche voraussichtlich aus äußeren Gründen nicht werde beenden können, möchte ich die bisherigen Ergebnisse kurz mitteilen.

Spirochaeta pseudoicterogenes marina Zuelzer, die morphologisch vielleicht noch eine größere Variationsbreite hat wie die Spirochaeta pseudoicterogenes aus dem Süßwasser, aber im wesentlichen morphologisch mit Spirochaeta icterogenes übereinstimmt, lebt im Meerwasser unter den gleichen ökologischen und soziologischen Bedingungen wie die Wasserspirochaeten im Süßwasser (Zuelzer 31). Während aber die Süßwasserspirochaeten durch Weilimmunserum nicht angegriffen werden, reagiert die Salzwasserspirochaete auf Weilserum mit Agglutination und Lysis, wenn auch nur mit einem hochwertigen Serum (Titer 1 : 30 000) und nur schwach (1 : 50 und 1 : 100).

Wie früher mitgeteilt, wachsen marine Spirochaeten in Ringerlösung oder in keimfrei filtriertem Meerwasser + 10—50% Kaninchenserum nur bei niederen Temperaturen, etwa bei 10—15°, und vermehren sich dabei recht langsam. Bessere Resultate von Kulturen mariner Spirochaeten erhielt ich mit Eiagar + steril filtriertem Meerwasser, ebenfalls nur bei niedriger Temperatur. Wurden Reinkulturen von Süßwasserspirochaeten sowie von Rattenspirochaeten direkt in Meerwasserkulturmedium gebracht, so starben sie allmählich ab. Eine Anpassung von Süßwasser- wie von Rattenspirochaeten an Meerwasserkonzentration gelingt aber bei langsamer Gewöhnung. Ich begann diese Anpassungsversuche mit 9 Teilen Süßwasser + 1 Teil Meerwasser bei etwa 12—15° und setzte dann langsam innerhalb 4—6—8 Wochen den Kulturen steriles Meerwasser zu, bis die Konzentration von reinem Meerwasser erreicht war. Bei so langsamer Gewöhnung gelingt es, diese Spirochaeten in reinem Meerwasser zu halten. Bei direkter Überführung in eine höhere Konzentration wie 2 Teile Süßwasser + 8 Teile Meerwasser gelangen keine Kulturen[1]).

Die Rückgewöhnung der Spirochaeten aus Meerwasserkulturen an Süßwasser geht dagegen sehr viel schneller vor sich wie die Anpassung von Süßwasserspirochaeten an Meerwasser; in einem Falle war die Rückgewöhnung bereits nach 6 Tagen beendet.

Die Vorgänge in der freien Natur stehen im Einklang mit diesen Beobachtungen.

Wird Rattenurin, der, je nach der Ernährung der Ratte, etwa 2—3% Salzgehalt haben dürfte, mit Süßwasser verdünnt, so bleiben die darin enthaltenen Spirochaeten auch am Leben! — Bisher habe ich meine Versuche nur mit Reinkulturen von Wasser- und Rattenspirochaeten durchführen können. Geplante Untersuchungen, spirochaetenhaltigen Rattenurin bei Meerwasserzusatz in steigenden Konzentrationen zu beobachten, konnte ich aus äußeren Gründen nicht mehr durchführen.

Auch Ruys hat zur Klärung von epidemiologischen Fragen, wohl aus ähnlichen Erwägungen, aus denen heraus ich die Möglichkeit einer Gewöhnung oder An-

[1]) Shiga hat in ähnlichen Versuchen Spirochaeta pseudoicterogenes in einer Konzentration von 1,2% Kochsalz, Weil-Spirochaeten nur in einer solchen von 0,8% Kochsalz halten können.

passung der Spirochaeten an Meerwasser prüfte, „parasitische" Spirochaeten in frischen Meerwasserproben beobachtet (zit. nach Schüffner 34). Sie konnte je nach Herkunft und Salzgehalt der Wasserproben ein Überleben der Spirochaeten in denselben nur bis zu 10 Tagen feststellen. Bereits Uhlenhuth und Zuelzer 1920 haben auf stark schädigenden Einfluß von NaCl-Lösungen auf Spirochaeten hingewiesen. Aber bei diesen Versuchen von Ruys, parasitische Spirochaeten direkt in Meerwasser zu bringen, mögen jedoch außer dem Salzgehalt noch andere Faktoren für Gedeihen oder Absterben der Spirochaeten maßgebend sein. Hat doch Sardjito auch die Erfahrung gemacht, daß sogar bei der Prüfung des Gedeihens von Spirochaeten aus Rattenurin in Süßwasserproben, sich unter 12 Wasserproben nur eine, die aus der Doelengracht in Leyden, zur dauernden Anpassung geeignet zeigte. Die einzelnen Faktoren, die für das Gedeihen ausschlaggebend sein könnten, lassen sich in einem, in allen Einzelheiten der Zusammensetzung bekannten Kulturmedium besser analysieren wie in natürlichen Gewässern.

Die Prüfung der Frage, ob in Dänemark die biologischen Vorbedingungen vorhanden sind, auf Grund deren mit der Möglichkeit von Auftreten und Verbreitung der Weilschen Krankheit zu rechnen sei, begann ich mit Wasseruntersuchungen. Diese wurden größtenteils mit der Eiagarmethode (Zuelzer 1936) durchgeführt.

Dänemark ist ein wasserreiches Land, ähnlich wie Holland; aber Holland ist viel dichter besiedelt, der Grundwasserspiegel liegt dort höher und Verunreinigungen seiner zahlreichen, oft miteinander in Verbindung stehenden Kanäle bieten eine nicht zu unterschätzende Gefahr für Infektionen durch Wasser. In Dänemark dagegen liegt der Grundwasserspiegel tiefer; zudem wird im Freien meist in Meer, aber nur wenig in Süßwasser gebadet und — abgesehen von den Städten — haben die meisten, z. T. weit auseinanderliegenden Bauernhöfe eigene Brunnen. Infolge dieser Selbstversorgung der einzelnen Gehöfte mit Wasser scheint für eine Ausbreitung der Spirochäten durch infiziertes Wasser keine große Gefahr zu bestehen.

Ferner gehört Dänemark zu den Ländern, in welchen die Rattenbekämpfung planmäßig durchgeführt wird; auch dadurch könnte vielleicht die Ausbreitung der Weil-Spirochaeten gehindert werden.

Zunächst wurde die Wasserleitung von Kopenhagen untersucht. Sie wird mit Tiefenwasser versorgt, welches in Mittel-Seeland erbohrt wird und p_H 7,5 bis 7,6 hat. Aus derselben wurden mühelos üppigste Kulturen von apathogener Spirochaeta biflexa syn. pseudoicterogenes gewonnen.

Weiter untersuchte ich freie Gewässer in Kopenhagen, sowohl Süßwasser wie Brackwasser. Aus dem Wasser zwischen der Langebro und der Badeanstalt, aus den Teichen an der Langelinie und in denen aus der Stadt (St. Jørgens Sø, Peblingesøen, Ørstedsparken, Christianshavns Voldgrav) wurde überall, meist vergesellschaftet mit Thiospirillen, Flagellaten, Oscillatorien, die Spirochaeta nachgewiesen. Alle diese Wässer zeigen p_H 7,3—7,5. Weiterhin wurden dann in der näheren Umgebung von Kopenhagen in kleinen Abflüssen, in Sumpfwasser, Dorfteichen die gesuchten Spirochäten mühelos gefunden. Überall liegt der p_H der Wässer zwischen 7 und 8. In der Umgebung von Kopenhagen und anschließend weiter auf Seeland wurden, um nur einige Untersuchungen zu nennen, mit positivem Ergebnis untersucht: Teich und Wassergraben in Frederiksvaerk (p_H 7,6), ein kleiner Dorfteich bei Hillerød, der Esrom Sø (p_H 7,9), der Teglgaards Sø (p_H 7,4) und der Fure Sø (p_H 7,4).

Die größten Mengen von Spirochäten, direkt mikroskopisch ohne Anreicherungsverfahren nachweisbar, wurden im Juli in Slots Sø in Hil-

lerød gefunden. Von Hillerød gelangen organische Verunreinigungen in den Slots Sø, welche dort von einer reichen Fauna und Flora von Entfäulern abgebaut werden. Der Seegrund ist von schwarzem, fäulnisfähigem Schlamm bedeckt. Die Oberfläche desselben ist überzogen von spinnwebartigen Schleiern von Beggiatoa und zwischen diesen Geflechten lebten Spirochäten vom icterogenes-Typ in größeren Mengen.

Auf Seeland, wo die meisten Gewässer den Wasserspirochäten die geeignetsten Lebensbedingungen bieten, konnte ich nur in zwei Seen, zu denen Herr Prof. Wesenberg-Lund die Güte hatte, mich zu führen, weder mit Anreicherungs- noch mittels Kulturverfahrens die gewünschten Spirochäten finden. Es waren dies der große und der kleine Gribsø. Diese Seen sind in alten, mit Sphagnum-Moos angefüllten Gletscherlöchern entstanden. Bekanntlich bildet sich in Sphagnum-Mooren Humussäure. Auch diese Seen, die, wie alle derartigen Gewässer, völlig kalkarm sind, haben p_H 5 resp. 4,7; daher bieten sie den Spirochäten keine Lebensmöglichkeiten, wie dies wohl auch in den Torfmoorgegenden von Schweden der Fall sein mag. Auf dem Moränengrund Dänemarks sind die Wässer sonst überall alkalisch; der Kalkgrund bietet zudem eine vorzügliche Pufferung. Ob in den Gegenden Jütlands, welche Sandgrund haben, die Verhältnisse in bezug auf die Spirochäten anders liegen, bedarf der Beobachtung. Bisher wurden diese Untersuchungen nur auf Seeland durchgeführt, wo sich alkalische, belebte Wässer befinden, eutrophe, planktonreiche Seen, die den Spirochäten günstige Lebensbedingungen bieten. Im Vergleich mit den Wasserverhältnissen in Ländern, in denen Weilsche Krankheit endemisch ist, ist dies epidemiologisch durchaus beachtenswert. Denn in der Wasserbeschaffenheit Dänemarks ist eine der wichtigsten Vorbedingungen für die Möglichkeit einer Übertragung und Ausbreitung der Weilschen Krankheit durch Wasser vorhanden.

Zusammenfassung.

Die Bedingungen, unter denen die Wasserspirochäten in natürlichen Gewässern leben, werden unter dem Gesichtspunkte ihrer Beziehungen zur Epidemiologie der Weilschen Krankheit erörtert.

Die Untersuchungen haben ergeben, daß die Spirochäten nicht nur, wie bisher angenommen, auf einer Unterlage, auf Schlamm usw., sondern auch planktonisch leben können, und zwar sowohl bei oligosaprober wie auch bei mesosaprober Lebensweise. In oligotrophen Gewässern sind die Spirochäten weit verbreitet, aber spärlich, in eutrophen Gewässern meist in größerer Anzahl anzutreffen.

Es werden Protozoen und Protophyten angeführt, mit denen die Spirochäten unter natürlichen Bedingungen zusammenleben.

Die Lebensbedingungen im Wasser für pathogene Leptospira icterohaemorrhagiae Inada syn. Spirochaeta icterogenes Uhlenhuth und für Spirochaeta pseudoicterogenes Uhlenhuth und Zuelzer sind die gleichen.

Die Wasseruntersuchungen auf Seeland in Dänemark haben ergeben, daß die belebten alkalischen Gewässer sowie die eutrophen planktonreichen Seen für Spirochäten günstige Lebensbedingungen bilden. In der Wasserbeschaffenheit Dänemarks ist eine der wichtigsten Vorbedingungen für die

Möglichkeit einer Verbreitung der Weilschen Krankheit durch Wasser vorhanden.

Literaturverzeichnis.

Hindle, A System of Bacteriology in Relation to Medicine. London. Vol. 8. 1931. p. 101. — Kolkwitz, Über die Schwefelbakterienflora des Solgrabens von Artern. (Ber. d. Dtsch. Bot. Ges. Jahrg. 1918. Bel. 36. Heft 4. S. 218.) — Kolkwitz, Pflanzenphysiologie. 3. Aufl. Jena (Gustav Fischer) 1935. — Kross und Zuelzer, Zentralbl. f. Bakt., Orig. Bd. 126. 1932. S. 360. — Kunstein, Ztschr. f. Immunitätsforsch. Bd. 75. 1932. S. 173. — Sardjito, Zentralbl. f. Bakt., Abt. I. Orig. 1932. S. 395. — Sardjito und Zuelzer, Zentralbl. f. Bakt., Orig. Bd. 110. 1929. S. 180. — Schüffner, W., Recent Work on Leptospirosis. (Transact of the Royal Soc. of Trop. Med. and Hyg. Vol. 28. 1934. No. 1. p. 7.) — Shiga, Ztschr. f. Immunitätsforsch. Bd. 40. 1924. S. 148. — Thiry, U., Arch. f. intern. Méd. exper. Vol. 6. 1931. T. 4. p. 471. — Uhlenhuth und Fromme, Weilsche Krankheit. (Handb. d. path. Mikroorg. 3. Aufl. Bd. 7. 1930. S. 487.) — Uhlenhuth und Zuelzer, Zentralbl. f. Bakt., Orig. Bd. 85. Beiheft. 1921. S. 141. — Winogradsky, S., Über Schwefelbakterien. (Bot. Ztg. Jahrg. 1887. No. 31—37. S. 489.) — Winogradsky, Beiträge zur Morphologie und Physiologie der Bakterien. Heft 1: Zur Morphologie und Physiologie der Schwefelbakterien. Leipzig (A. Felix) 1888. — Zuelzer, Marg., Arch. f. Protistenk. Bd. 24. 1911. S. 1. — Zuelzer, Marg., Die Spirochaeten aus: Prowazek, Handb. d. pathol. Protozoen. Bd. 3. Lief. 11. Leipzig 1925. S. 1627. — Zuelzer, Marg., Zentralbl. f. Bakt., Orig. Bd. 105. 1928. S. 384. — Zuelzer, Marg., Tierwelt der Nord- und Ostsee. Lief. 20/II f. 1—23. Leipzig (Akad. Verlagsanst.) 1931. Zentralbl. f. Bakt., Orig. Bd. 136. 1936. S. 194.

A new Nephelometer and its Application in Microbiological Nephelometry[1].

[From the Physical Laboratory of the University Utrecht, and the Microbiological Laboratory of the Technical University, Delft.]

By **J. M. W. Milatz** and **P. B. Rottier.**

With 4 figures in the text.

I. Introduction.

The determination of the approximate number of microorganisms present in a suspension by judging its turbidity with the naked eye is only a very rough method. Its advantages, however, are the great ease and especially the rapidity by which such determinations can be carried out as compared with a direct microscopic count or by plating.

These reasons have led in later years to a search for refinements in the measurement of turbidity and have given rise to the construction of several apparatuses. All these are based on two mutually connected properties of suspensions, the power to absorb and the power to scatter the light. According to the principle on which these instruments are based, one can divide them in two classes:

a. Instruments, measuring the weakening of the intensity of a beam of light passing through the suspension; they are called extinctiometers.

[1]) The apparatus is manufactered by N. V. P. J. Kipp & Zonen, Delft, Holland.

b. Instruments measuring the scattering power of suspensions; the designation nephelometer should be applied only to these instruments.

The best of the apparatuses of class a is the extinctiometer of Moll (1, 1920), introduced in bacteriology by Strausz (4, 1930). This apparatus measures the absorption of a suspension against that of the medium, in which the suspension is made, with the aid of two thermocouples, compensating each other. A disadvantage of this instrument is, however, its high cost.

Williams, McAlister and Roehm (3, 1929) measured the absorption of yeast suspensions with the aid of a self-built thermocouple, connected with a galvanometer. The intensity of the light of an incandescent lamp is measured with the thermocouple directly and after being decreased by the absorption of a suspension, placed between the light-source and the couple. From this decrease the number of particles of the unknown suspension can be estimated after calibration with suspensions of known density. Their apparatus can be called a simplification of the highly accurate extinctiometer of Moll.

Richards and Jahn (6, 1933) described a new instrument working on the same principle as that of Williams and Roehm. They used a photocell and measured the absorption of the suspension in simple glass tubes.

A nephelometer has been constructed by Poskett (2, 1927). He used a special box in which he compared with the naked eye the scattering power of yeast suspensions with that of a standard series of $BaSO_4$-suspensions. High accuracy can not be expected with this method.

In the year 1932 Frank (5) gave a description of a nephelometer, built by him for the investigation of mitogenetic rays. This instrument is somewhat a parallel of Moll's meter, as it is equipped with two photocells (potassium cells), compensating each other. It measures, however, the scattering power of a suspension of bacteria against that of some other suspension.

The generally feeble intensity of the light scattered by bacterial suspensions of usual densities asks for extremely sensitive photocells, especially for slight turbidities.

A simplification of this instrument is worked out by Andrejow and coworkers (10, 11, 1932). In this nephelometer only one photocell is used. The apparatus is only applicable for the examination of suspensions with more than some 200 millions bact./cm³. It is obvious that the feeble intensity of the light scattered by suspensions containing less bacteria is the cause of this limitation.

II. Description of the new apparatus.

At the request of Prof. A. J. Kluyver of Delft a new apparatus has been designed by the first named author. It is based on a combination of the nephelometric and extinctiometric principle, and has about the same accuracy as a Moll-meter, even may surpass this instrument in the case of dilute suspensions. Moreover it is simple and cheap and as little as 3½ cm³ are sufficient for a measurement.

Figure 1b illustrates the principle of the instrument.

The horizontally placed filament of an incandescent lamp T is projected by means of a condensor K into the vessel C. The scattered light illuminates a number of small scratches, which are drawn upon a mirror M. The observer, at E, perceives these scratches through an eyepiece as bright yellow lines. The latter contains a yellow filter in order to enable one to work with more or less monochromatic light. The denser the suspension in the vessel the more intense the lines.

After the light has passed through the vessel, it goes through a reducer W, consisting of a circular disc of glass, on the circumference of which is fitted a logarithmical wedge. By turning this disc the light is reduced in a ratio, varying between 1 : 1 and 1 : 80. A scale divided into 200 units is fitted into the reducer.

After that the light falls upon a concave mirror H, that focusses it upon

a milk glass F, which illuminates the mirror M. In this way the total field of vision is illuminated except the scratches.

When the reducer is adjusted in such a way that it transmits as little light as possible, one observes only the bright lines. As the reducer is turned, the lines at first will remain bright on a dark background. At a certain position of the reducer the intensity of the background becomes equal to that of the lines: they cannot any longer be distinguished. This is the correct adjustment. As one goes on turning, the lines appear dark on a bright background.

The reading of the apparatus is therefore based on the same principle as the optical pyrometer.

It is obvious that the position of the wedge at which the lines disappear is independent of the intensity of the light source. Therefore the current for this lamp can be drawn from the townmain, even when its voltage is subject to fluctuations.

An additional reducer placed at F shifts the region of observation to lower values. One can continue in this way till the accuracy begins to decline in consequence of the decrease in brightness of the lines.

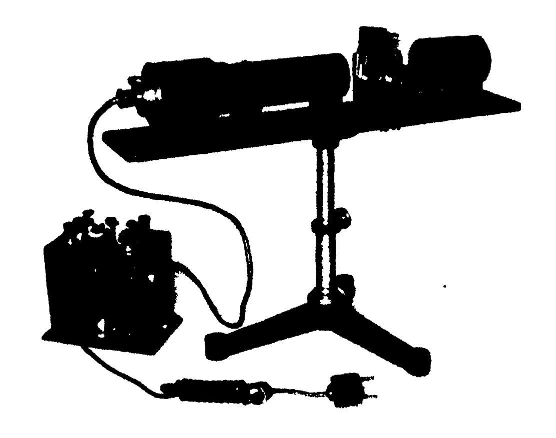


Fig. 1a.

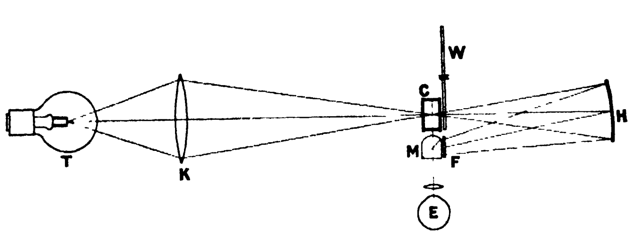


Fig. 1b.

III. The reading.

The reading must be done in a dark room. As has already been remarked the correct reading is obtained when the intensity of the lines is the same as that of the background. Now the various lines do not have exactly the same intensity. So one of these lines must be chosen for the reading, e. g. the middle one. Even this does not disappear as a whole. As a rule the adjustment was done in such a way that the greater part of the line was seen already as a feeble dark stripe and as moment of the reading the disappearance of the last bright point was taken. Readings are easily reproducible within 2—3 units of the scale. This can be reduced to 1 unit by making several readings and taking the mean.

A better and more rapid method is, however, to make several observations in succession and to determine which reading is most frequently found. For in bacteriological technique it is seldom possible to exclude

fully the occurrence of small fibres etc. in the suspensions. These impurities will float along the scratches and change the intensity of the lines in an irregular manner. Hence one should continue the observation until a constant reading is obtained. The fibres, as a rule already observable with the naked eye in the suspension as bright points or threads, will raise the reading. One should not hesitate to discard a few readings, which are too high, but adjust several times and determine in what unit the greater part of the readings fall. The necessary experience will be obtained quickly. If the suspension is not too much contaminated with fibres four or five readings, differing no more than one unit, will be obtained within one minute.

Stress must be laid upon the fact that this possibility of discerning contaminations and consequently eliminating their effect is a real advantage of the method, though it makes reading more difficult. In those apparatuses, where this possibility does not exist, one is never certain that the absorption measured is exclusively due to the particles to be counted.

IV. Calibration.

It is difficult to define clearly what is to be understood by the "number" of bacteria per unit volume. As a rule there is a marked difference between "viable" and "total" counts. The nephelometric count corresponds more closely with the latter but also in this respect there remain some difficulties to be considered.

Firstly all non-bacterial contaminations also scatter and absorb light. This is best to be seen with darkground illumination under the microscope. In addition to the bacteria always some bright grains will be found and generally in variable quantity.

The second disturbing factor, perhaps the most disagreable one, is the great dependency of the scattering on the size of the particles. Seldom micro-organisms will occur single in suspensions, mostly they will be found in aggregates of two or more. This will hold especially for young cultures, where, owing to the growth process, nearly all bacteria will occur in shorter or longer chains. Cultures of staphylococci, streptococci etc. are practically not to be obtained without clusters of several individuals. These clusters will scatter the light as single particles of a bigger size than that of the bacteria, giving stronger scattering. Consequently experience shows that it is impossible to obtain suspensions with exactly the same cell distribution, so that a calibration made with one suspension always differs to some extent from that made with another.

For these reasons it is obvious that by measuring the scattering or extinction of suspensions of microorganisms one does not obtain the absolute number of organisms present.

The calibration of the instrument described here can best be carried out with the aid of the special counting chambers for bacteria, which have a depth of 0,02 mm or, better, 0,01 mm (Wilson, 14, and Steiner, 15).

Rapid and accurate results are obtained with darkfield illumination, using the bacteria in their natural medium, if desired after addition of some thymol or formaldehyde. At the same time an idea will be obtained how much non-bacterial contamination is present, for the bacteria are seen as little bright rings whereas other particles appear as points. Direct counting in the Thoma-Steiner chamber is only possible with suspensions containing more than 40 millions bact./cm^3.

It is obvious that the accuracy of the absolute calibration of the nephelometer is dependent on that of the direct count, which in the way described implies that deviations of hardly less than 10% must be tolerated.

A calibration is first performed with an optically empty medium such as distilled water or a physiological salt solution (0,5—0,9% NaCl). A few cm^3 of a dense suspension are put aside for the direct count and another 10 cm^3 are used for making several dilutions with the same medium (1 : 2, for example). The calibration with an optically empty medium is necessary for the following reason. The usual media in which the bacteria are suspended have a relative high turbidity of their own. Mostly this varies greatly for different batches so that a calibration with such a medium is unsuitable for subsequent measurements. If now the calibration curve is obtained in distilled water it is possible to determine firstly the degree of turbidity of the medium in which a suspension is made and see with what density of bacteria it is equivalent, say with A millions bact./cm^3. When the suspension is then equivalent with B millions bact./cm^3 the real number of bacteria in the suspension is B—A millions bact./cm^3.

In addition to the foregoing it has to be taken into account that in such media as peptone water, broth etc. changes of temperature often give rise to changes of turbidity. The same occurs by making dilutions with the aid of liquids other than the initial one. Finally the micro-organisms themselves can change their optical behaviour during growth.

Altogether it is obvious that nephelometry is not particularly adapted to determinations of the absolute numbers but that is especially useful for measuring changes in number (study of growth processes etc.).

V. Some general remarks on extinctiometry and nephelometry.

We will consider a beam of light falling through a suspension, whilst neglecting the scattering and the absorption of the medium. The intensity of that beam will be diminished firstly as the result of absorption by the particles; this absorbed light is further lost. Secondly every particle will scatter some part of the light to all directions, as a consequence of which the intensity of the light transmitted by the suspension is again decreased. It is obvious that the more light is absorbed by a particle the less is the amount scattered. Now the way by which both extinction and scattering are connected is rather complicated (cf. Boutaric, 12).

The total decrease in light intensity when passing through a suspension should be called the extinction of that suspension. It is this extinction, commonly simply designated as absorption, that is measured by the extinctiometer.

As for the dependence of the extinction on the number of particles measurements carried out by several physicists show that for particles with a size of 1—12 μ this relation is best expressed by an exponential function, thus yielding a straight line if plotted on a semi-logarithmical scale and a smooth curve if this is done on a normal scale (3, 4, 9, 12, 13).

Therefore the finding of a direct proportionality between absorption and number of bacteria, as is reported by Richards and Jahn, can scarcely be correct. Jennison mentions that he found a deviation from this simple relation with the same apparatus, but his calibration curves, composed of two straight lines meeting under an obtuse angle can not be accurate either. Undoubtedly a smooth curve should have been found.

In this connection it should be remarked that accurate measurements can never be obtained by using ordinary glass tubes, as was done by the last mentioned investigators, since the walls of such tubes never show homogeneous optical properties. Marking of these tubes so as to make possible replacing them in the same position does not suffice to remove this difficulty. Even the accuracy of a Moll-meter is mostly limited by the impossibility of removing and replacing the cuvette specially constructed for this apparatus without changing the reading and this only because it is impossible to give it exactly the same position again.

As for the dependency of the scattered light on the number of particles theory is not yet quite settled. For particles small compared with the wave length of the light used, formulae exist, for which we must refer to the physical textbooks. These formulae cannot be used for particles of the size of microorganisms. It is generally accepted that in this case too a direct proportionality exists between the number of particles and the amount of light scattered (8, 10, 11). So the empirical formule: $J = k. n. D^2$ is proposed by Angerer, Muntner, Andrejew (10) for spherical particles. In this formula J = intensity of the scattered light, n = number of particles, D = diameter of these, k = a constant. Awtonomowa and Stessel (11) tested for bacteria of other shape (rods) the formula: $J = k. n. r. \sqrt{l}$, in which r = radius, l = the length of the bacteria. Their figures show fairly constant value for k; for B. thyphosum and B. dysenteriae a value 3.10^{-7} was found. However, their method of shaking the suspension for one hour with glass beads and after that filtering through paper in order to homogenize the suspension is objectionable. There is much danger that a great percentage of the turbidity will have been caused by glass powder. Although the last mentioned publications would seem to demonstrate a direct proportionality between the number of particles and the amount of light scattered this may only be approximate (12). For instance after Teorell (9) the amount of scattering does not increase proportionally with the number of particles.

In any case the amount of the light scattered depends both on the wave length of the primary beam and strongly on the size of the particles.

In general it can be said, that in all methods in which the one-cell principle is applied, constancy of the source of light is of course a factor of primary importance. It is difficult to obtain this even with a low-voltage lamp, burning on a big accumulator, as is used with the Moll-meter, when observations are made during a period of several hours. Although the double equipment of this instrument eliminates the greater part of this inconstancy, the galvanometer runs with time (e. g. 3—5% in absorption in 8 hours) because the apparatus is never wholly symmetrical.

The light intensity of incandescent lamps is highly dependent on the intensity of the current. Small variations in voltage give large variations in light intensity. Furthermore higher temperature of the filament gives more light of shorter wave length, which again changes the rate of absorbed and scattered light. Therefore it is necessary with instruments of the one-cell construction to use filters to obtain practically monochromatic light.

For high densities of the suspension extinctiometry is more accurate than nephelometry; for low densities the reverse holds good. This can be illustrated in the following way. If we consider two suspensions absorbing 10 and 11%, a difference should be found by measuring the difference bet-

ween 90 and 89% of the light transmitted. This asks for an accuracy 1 to 90 i. e. of approximately 1%. If the amounts of the scattered light — proportional to 10 and 11 — are measured, the reading of the difference only asks for an accuracy of 10%.

VI. Some calibration curves of the new nephelometer.

The apparatus described here has been constructed in such a way that the relation between the readings and the number of particles, plotted on semi-logarithmical paper in normal cases yields a straight line. This result was obtained by measuring the ratio of the intensities of the scattered light and the absorbed light instead of measuring the intensity of the scattered light alone. This way of calibration has the advantage that in this case the accuracy is the same over the whole range.

Now with suspensions of very fine $BaSO_4$ or with mastic sols the lines have indeed been found straight, as is illustrated by curve V in Fig. 2. With suspensions of bacteria, milk, yeast, etc. the lines have, however, a distinct curvature, so that for a calibration several points have to be read. An explanation of this deviation is not easily given. The steepness of the calibration curve depends on the dimensions of the particles in suspension. If it be assumed that the bigger the particles, the less steep the line, the decrease in steepness of the calibration curves found with bacteria at higher densities of the suspensions can be interpreted as due to an agglutination of the bacteria in that region, because hereby the dimensions of the scattering particles, i. e. the bacterial complexes, are increased. Such a clustering does not seem to occur with suspensions of $BaSO_4$ or mastic.

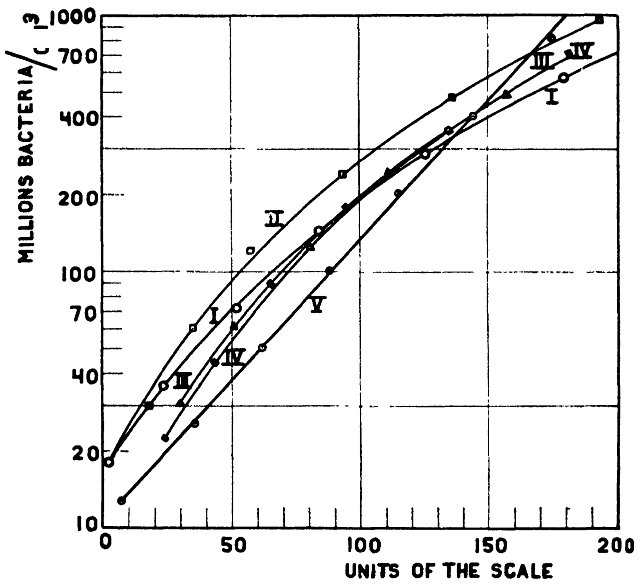


Fig. 2. Calibration curves of the nephelometer. I. E. coli suspended in distilled water. — II. E. coli suspended in ½% saline. — III. E. coli suspended in 2% saline. — IV. E. coli suspended in 2% saline (culture six weeks old). — V. Mastic sol in distilled water (given in an arbitrary scale).

The tendency towards agglutination of bacteria seems to be different in different media. Thus suspensions of E. coli from peptone agar + ½% NaCl made either in distilled water or in distilled water with the addition of ½% NaCl or of 2% NaCl, after dilution 1 : 2 with the corresponding liquids, yielded the curves I, II and III from Fig. 2. The data for these curves are given in table 1. A direct count was made of the suspensions after the first dilution.

Table 1.
Calibration data for suspensions of E. coli in distilled water, ½% NaCl and 2% NaCl.

dist. water		½% NaCl.		2% NaCl.	
r.	n.	r.	n.	r.	n.
179	576.10^6	192,5	960.10^6	157	492.10^6
125,5	288.10^6	136	480.10^6	111	246.10^6
84	144.10^6	93,5	240.10^6	80,5	123.10^6
52	72.10^6	57,5	120.10^6	51	$61,5.10^6$
23,5	36.10^6	35	60.10^6	30	$30,8.10^6$
2	18.10^6	18	30.10^6		

r. = reading of the nephelometer.
n. = number of bact./cm^3.

As will be seen from Fig. 2 the curves I and II have not the same steepness at lower density, whereas curve III follows curve II at this point. This curve is shifted to the left of I because, owing to osmotic phenomena, the bacteria will be smaller in ½% saline than in distilled water and therefore, if present in a given number, scatter less light. Against expectation the curve for the suspension in 2% NaCl is not found to the left of curve II, though microscopic examination shows that as a result of osmosis the bacteria are still smaller than in the medium with 0,5% NaCl. These deviations must be due either to phenomena of agglutination or to changes in the optical behaviour of the bacteria in the saline. Within limits the age of the bacteria does not seem to have much influence as is illustrated by a calibration curve obtained with a suspension of a six weeks old culture of E. coli in 2% saline. The data for this curve marked IV in Fig. 2 are given in table 2. The slight discrepancies between curves III and IV at the lower densities show that the younger bacteria seem to have a somewhat greater tendency towards clustering.

Table 2.
Calibration data for a 6 weeks old culture of E. coli suspended in 2% saline.

reading	number of bacteria per cm^3
181	710.10^6
135	355.10^6
94,5	178.10^6
65,5	89.10^6
43,5	$44,5.10^6$
24	$22,3.10^6$

In table 3 the calibration data for E. coli suspended in peptone water + ½% NaCl are given.

The last reading, 102, represents that of the suspension medium without bacteria.

From Fig. 2, curve II, one can derive that this reading corresponds to 275.10^6 bact./cm^3 in distilled water + ½% NaCl. The highest reading obtained with the suspension in the peptone medium, viz. 174, has the same turbidity as a suspension of 780.10^6 bact./cm^3 in distilled water + ½% NaCl.

Table 3.
Calibration data for E. coli suspended in peptone water + ½% NaCl.

reading	number of bacteria per cm^3
174	584.10^6
143	292.10^6
123	146.10^6
112,5	73.10^6
105,5	36,5. 0^6
102	—

We may therefore conclude that the difference between these two values would be the result of the scattering caused by the bacteria themselves. This difference aomunts to 505.10^6 bact./cm^3, whereas direct count gave 584.10^6 bact./cm^3, an agreement which may be deemed satisfactory.

Hence the conclusion seems justified that in making estimations of bacterial densities in media which are not optically empty, the calibration curves obtained with an optically empty medium can be used by applying the correction for the blank medium expressed as an apparent number of bacteria per cm^3. In several batches of a number of different media the blank value has been found to range from 30 to 140, which corresponds to some 40 to 400 millions of E. coli per cm^3.

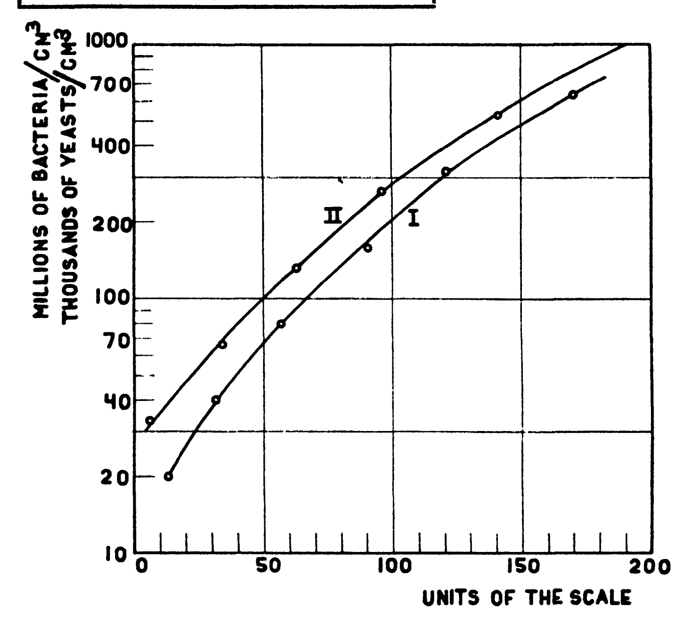


Fig. 3. Calibration lines of the nephelometer.
I. Staphylococcus pyogenes aureus suspended in ½% saline. — II. Saccharomyces cerevisiae suspended in distilled water.

Table 4.
Calibration data for Staph. pyogenes aureus in ½% saline.

reading	number of bacteria per cm^3
170	636.10^6
121	318.10^6
90,5	159.10^6
57	79,5. 0^6
31,5	40.10^6
13	20.10^6

The calibration data for Staphylococcus pyogenes aureus in ½% saline is given in table 4, for the yeast Saccharomyces cerevisiae in distilled water in table 5. Fig. 3 gives the corresponding curves.

Table 5.
Calibration data for Saccharomyces cerevisiae in distilled water.

reading	number of bacteria per cm^3
197	1056.10^3
141	528.10^3
96	264.10^3
63	132.10^3
34	66.10^3
6	33.10^3

The following figures may give some idea of the relatively small influence of changes in voltage of the current for the light source on the readings.

voltage	reading
6	70,5
8	73

The very marked difference of 25% in voltage for a lamp designed for 6 volts, gave only a difference in reading of 2½ scale units.

VII. On the accuracy of the method.

In how far an absolute count can be obtained with the new nephelometer will be left out of consideration here. Attention will be directed to the possibility of rapidly determining changes in bacterial number in various media.

The accuracy of such determinations is to a large extent governed by the experimental conditions.

In the beginning we tried to find out which were the smallest detectable differences in bacterial numbers (as percentages) in broth cultures. To a suspension of about 20 millions bact./cm^3 (Staph. pyog. aureus) killed by the addition of formaldehyde were added known quantities of a denser suspension treated in the same way, so that suspensions containing 22, 24, etc. millions per cm^3 were obtained. It appeared impossible to detect with certainty differences smaller than 20%. Also the tubes, to which nothing had been added, sometimes gave increased readings. This was apparently due to the fact that insufficient care was taken to avoid contamination with dust particles, small fibres etc.

It is obvious that the turbidity of the broth itself greatly influences the accuracy of the determination of bacterial numbers. As will be seen from the calibration curves the value of one scale unit corresponds with about 2% of the number of bacteria. This value is practically constant all over the nephelometer scale because this is logarithmical. The fact that the relationship between the bacterial numbers and the turbidity expressed in scale units is not strictly logarithmic implies that the value of a scale unit is not quite constant; the accuracy is thereby decreased in the range

of lower and increased in that of higher densities. If now the total turbidity is caused for e. g. 80% by the medium used and for 20% by the bacteria, then the mentioned accuracy of 2% per scale unit means an accuracy of 10% with regard to the number of bacteria.

In order to obtain the greatest possible accuracy it is therefore of great importance to use clear media, especially when suspensions with only a small number of bacteria are investigated. For the same reason contaminations of the suspension by dust or by small fibres of cotton-wool must be avoided as much as possible. For this purpose glass caps were used instead of cotton-wool in the later experiments and the broth was always filtered two or three times through the same filter. Moreover the filtered suspensions were left in contact with the air as short as possible.

Summarizing it can be said that for ordinary work the accuracy of reading differences in number of bacteria in broth etc. is some 20% for low, increasing to some 5% for high densities. In very clear media and with the careful way of reading as described these values can be reduced to 10% and 2½%.

VIII. Application of the apparatus in the study of growth curves.

The apparatus is very appropriate for the study of growth curves and numerous experiments have already been carried out in this direction. However, we will confine ourselves in this paper to a few results, showing the accuracy that can be obtained in duplicate experiments. If the observations are restricted to a period of no more than 6—8 hours, absolute asepsis is not needed as contaminations will not influence the measurements within that period anyhow. The cultures can be incubated in ordinary test tubes. At given moments the cultures are slightly shaken, a few cm^3 are withdrawn and after finishing the determination the sample is added again to the cultures. The differences between duplicate cultures, if a rigorously standardized procedure is adhered to, are only slight as can be inferred from the data of table 6, obtained with two cultures of Staph. pyogenes aureus in peptone water at 37° C. The reading for the uninoculated peptone water was 86. The greatest difference observed between the readings for the two cultures amounted to only 4 units (after 5 hours) which corresponds to about 15% in the number of bacteria.

Table 6.
Growth curves of two duplicate cultures of Staph. pyogenes aureus.

time	reading	
0 hours	86,5	86,5
2 ,,	87	88
4 ,,	114	115
5 ,,	138	142
6 ,,	153,5	154
7 ,,	161	161

Curve 4 of Fig. 4 in which these values are plotted on ordinary graph paper shows an approximation to the logarithmic phase of growth which in the ideal case would appear as a straight line, due to the logarithmic cali-

bration of the nephelometer scale, at least if the small curvature of the calibration line is neglected.

In cases where a greater accuracy is wanted it is recommendable to cultivate the bacteria in the special cuvettes which are used for the nephelometric determinations. In this case vessels which are bigger than the ordinary ones, e. g. vessels with a capacity of 15—20 cm³, should be used. The depth of these vessels must, of course, be the same as that of the original vessel. They are sterilised, covered with a glass lid and kept sterile till the moment of use by filling them with dilute alcohol (50%).

In experiments of this type the nephelometer, together with the vessels, was placed in a constant temperature room. Working in this way offers two advantages, namely that there is no need for cooling the cultures before reading and that agitation of the cultures leading to an unreproducible aeration is avoided. Both cooling and aeration were disturbing factors in the earlier experiments.

Sedimentation of the bacteria during the experiment can be eliminated by slightly shaking the vessels before each reading.

In this way the figures of table 7 were obtained with a culture of E. coli, old 19 hours, in broth at 30° C. The first series is illustrated by Fig. 4, curve II. The reading of the uninoculated broth was 51.

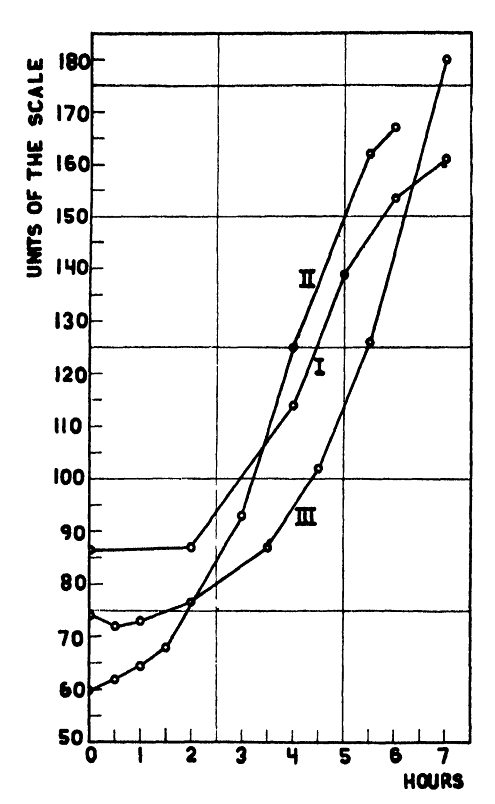


Fig. 4. Some growth curves measured with the nephelometer.
I. St. pyog. aureus in peptone water at 37° C. — II. E. coli in broth at 30° C. — III. Sacch. cerevisiae in yeast extract + 5% saccharose at 30° C.

Table 7.
Growth curves of the duplicate cultures of E. coli.

time	reading	
0 hours	60	60
½ ,,	62	62
1 ,,	64,5	65
1½ ,,	68	69
3 ,,	93	93
4 ,,	125	125,5
5½ ,,	162	163
6 ,,	167	167

The tendency to settle is greater with yeasts than with bacteria. Yeast cultures must therefore be thoroughly shaken immediately before making a reading; little bubbles of carbon dioxide will, of course, spoil the calibration. Table 8 gives the data for two growth curves of Saccharomyces cerevisiae in yeast extract + 5% sucrose at 30° C. These data are plotted in Fig. 4, curve III. The reading of the uninoculated yeast extract medium was 59.

Table 8.
Growth curves of two duplicate cultures of Saccharomyces cerevisiae.

time	reading	
0 hours	74	75
½ ,, ...	72	74
1 ,, ...	73	73
2 ,, ...	76,5	75,5
3½ ,, ...	87	87
4½ ,, ...	102	101
5½ ,, ...	126	125,6
7 ,, ...	180	184

The figures of table 8 show that in the beginning a decrease in turbidity seems to occur which may be due to the heating of the medium to 30° C. This phenomenon was often observed in most media. In broth, peptone water etc. the decrease was mostly restricted to only 1 unit. It is realized, however, that such small differences may also be due to limitations in the accuracy obtainable with the apparatus.

Summary.

A new nephelometer is described with the following characteristics:

1. independent of the intensity of the source of light.
2. simple and cheap.
3. logarithmical scale.
4. straight calibration line for non-microbical suspensions.
5. accuracy of 2% of the total scattering power of the suspension to be measured. This means an accuracy of 20—5% of number of micro-organisms in ordinary media and one of 10—2½% in very clear media. Here the higher figures of each set pertain to low, the lower ones to high densities of the suspensions.
6. measurements can be made with as little as 3—3½ cm^3 suspension.
7. the apparatus is especially adapted to the study of growth curves.

We are greatly indebted to Prof. L. S. Ornstein, who kindly permitted the construction of the instrument in the workshop of his institute and to Prof. A. J. Kluyver for their interest and assistance.

References.

1. Moll, W. J., Verslag. Akad. Wetenschappen A'dam. Bd. 28. 1919/20. S. 1001. — 2. Peskett, G. L., Biochem. Journ. Vol. 21. 1927. p. I, 460. — 3. Williams, R. J., McAlister, E. D., and Roehm, R. R., Journ. Biol. Chem. Vol. 83. 1929. p. 315. — 4. Strausz, W., Zentralbl. f. Bakt., Abt. I. Bd. 115. 1930.

S. 228. — 5. Frank, F., Biol. Zentralbl. Bd. 52. 1932. S. 1. — 6. Richards, O. W., and Jahn, T. L., Journ. Bact. Vol. 26. 1933. p. 385. — 7. Jennison, M. W., Journ. Bact. Vol. 28. 1934. p. 107. — 8. Kleinmann, A., Biochem. Ztschr. Bd. 137. 1923. S. 144. — 9. Teorell, T., Koll. Ztschr. Bd. 53. 1930. S. 322; Bd. 54. 1931. S. 58 and 150. — 10. Andrejew, N. N., Kudrjazew, N. A., and Stessel, T. A., Koll. Ztschr. Bd. 52. 1930. S. 184. — 11. Awtonomowa, E. S., and Stessel, T. A., Biochem. Ztschr. Bd. 274. 1934. S. 220. — 12. Boutaric, A., Rev. Opt. 1932. p. 145. — 13. Canals, E., and Hortala, A., Bull. Soc. Chim. Biol. Vol. 15. 1933. — 14. Wilson, G. S., Journ. Bact. Vol. 7. 1922. p. 405. — 15. Steiner, M., Zentralbl. f. Bakt., Abt. I. Bd. 113. 1929. S. 306.

Studies on the Nutrition of Zootermopsis.

I. The Rôle of Bacteria and Molds in Cellulose Decomposition[1]).

By R. E. Hungate.

University of Texas, Austin, Texas.

Following the fruitful researches of Cleveland (6, 7, 8, 9) on the role of protozoa inhabiting the alimentary tract of termites, the termite genus Zootermopsis (Termopsis) has been the subject of numerous investigations.

Many of these investigations have been directly or indirectly concerned with termite nutrition and have materially increased our knowledge of this aspect of termite physiology. But the number of different kinds of organisms in the termite-protozoa-mold-bacteria association complicates the analysis of their nutritional relationships, so that, although some facts are well established, and attractive hypotheses as to the nature of the relationships between the various groups of organisms have been advanced, most of these explanations are insufficiently supported by experimental evidence to warrant their acceptance as final. The present work was begun in an attempt to further the solution of the problems of termite nutrition by obtaining definite information on the importance of cellulose-digesting bacteria and molds in colonies and in individuals of Zootermopsis.

Before Cleveland (7) accepted the protozoa as the organisms responsible for the digestion of cellulose in the termite, Reticulitermes flavipes, "All the known methods, aerobic and anaerobic, for isolating cellulose decomposing bacteria were given more than fifty trials" but the results of these experiments were negative. From the context of this portion of Cleveland's paper it would appear that the termite gut content was used as the inoculum for all cultures and that these cultures were designed primarily for the detection of cellulose-decomposing molds and bacteria rather than for their isolation: No such bacteria could be shown to be present.

Beckwith and Rose (2) inoculated the gut contents of a number of species of termites, including Zootermopsis angusticollis, into aerobic and anaerobic flasks containing an inorganic medium plus filter paper. In eleven out of eighty-five aerobic cultures (one out of six in the case of Zootermopsis) the presence of cellulose-decomposing organisms was indicated by the disintegration of the filter

[1]) The experiments reported in this paper were performed at Stanford University and the Hopkins Marine Station.

paper ten to ninety days after inoculation. Microscopic examination of these cultures showed Gram negative rods and some micrococci. With anaerobic cultures there was no cellulose decomposition. These authors conclude that "with media built up more closely in accordance with the environment of the intestine, this flora may appear more often and may show greater velocity in reactions produced".

Using material from a termite colony (probably Reticulitermes flavipes, although this is not stated). Dickman (10) found that marked discoloration or cutting of filter paper at the liquid level occurred in twenty out of twenty-two aerobic enrichment cultures. The causal organisms included both bacteria and molds. Cellulose digestion was observed in only one out of nine anaerobic enrichment cultures from this same colony. The positive culture was incubated at 60.5° C. The material which was used in these inoculations was composed of wood particles, termite excreta, and a small amount of reddish clay.

When the intestinal contents of Reticulitermes flavipes were used as an inoculum Dickman observed cellulose digestion in none of fifteen anaerobic enrichment cultures and in only one of thirty-four aerobic cultures. Bacteria were the agents of cellulose digestion in this one positive culture.

Using material from another termite colony (probably Zootermopsis) Dickman observed green and wine-colored discolorations on filter paper in one aerobic enrichment culture. Cellulose digestion was observed in another culture containing both molds and bacteria. Two cultures gave no growth of cellulose-digesting organisms. Using enrichment cultures under aerobic and anaerobic conditions no cellulose-digesting bacteria or molds could be detected in the alimentary tract of Zootermopsis angusticollis.

Although from these experimental results it appears probable that the cellulose digestion by bacteria and molds in the interior of Zootermopsis is of little significance to the termite, the few instances in which cellulose-decomposing organisms have been found lend some weight to the suggestion that with the proper culture medium it may be possible to show that they are of importance in digesting cellulose within the alimentary tract of the termite. Although it may seem wasteful of time and energy to reopen the question of the significance of bacteria and molds in the digestion of wood within the termite, the complete solution of the mechanisms by which the organisms of the termite colony are related can only be achieved by a series of steps, each so well founded as to be acceptable without reservations.

Furthermore, although Dickman has shown the presence of cellulose-decomposing molds and bacteria in the burrows and excreta of termite colonies, the extent of their cellulose-digesting activities has not been investigated. The observation of Cleveland (7) that defaunated termites lived longer upon fungus-digested cellulose than upon unattacked cellulose suggests that digestion of this material by fungi renders it available to termites deprived of their protozoa. But may not such digestion by fungi also play a part in the nutrition of the faunated individuals? When it is recalled that bacteria and molds have been found to be extremely important in most biological processes of cellulose decomposition, the activities of these organisms in decomposing wood in the Zootermopsis colony should be considered negligible only after conclusive experiments have provided justification for such a step.

A. Cellulose-decomposing molds and bacteria in the alimentary tract of Zootermopsis.

Molds can be eliminated as possible agents decomposing cellulose within the alimentary tract of Zootermopsis since a microscopic examination shows that molds are not sufficiently numerous in the gut to be of any signifi-

cance. Their occasional growth in cellulose enrichment cultures inoculated with the gut contents does not indicate that these molds are of importance in cellulose digestion in the gut, but rather that they are ingested with wood from the wall of the burrow and are not immediately killed by the digestive enzymes of the termite.

Although bacteria are numerous in the termite gut they do not present a microscopic appearance similar to that of the known cellulose-decomposing bacteria. Occasionally they may be observed loosely clustered about wood particles but groups of bacteria similar to those upon the wood can be seen floating in the gut fluid and it seems likely that the wood-bacteria union is a temporary contact by chance.

A microscopic examination alone, however, is an inconclusive test for the presence of cellulose-decomposing bacteria. A more reliable method is to inoculate the material to be investigated into media suitable for the growth of such bacteria.

Enrichment cultures for cellulose-decomposing bacteria were made according to Omeliansky (12) and Winogradsky (15). The suitability of these methods for detecting cellulose-digesting bacteria was first tested by inoculating with manure or garden soil and incubating at temperatures of 20—30° C.

Aerobic cultures were made in flasks containing tapwater, .1% KNO_3, .05% $MgSO_4$, .05% K_2HPO_4, and filter paper or cotton. In addition, a solid medium of 2% agar and the above salts was used. After solidification, the agar containing the inorganic constituents was covered with a layer of filter paper or cotton. Minute particles of soil were placed at various spots on the plate which was then incubated.

Yellow and transparent spots soon appeared around the particles of soil and the paper became soft and easily separated. Microscopic examination disclosed large numbers of bacteria clustered upon and within the fibers, which showed every evidence of decomposition.

The anaerobic medium contained tapwater, .1% $(NH_4)_2SO_4$, .05% $MgSO_4$, .5% K_2HPO_4, 2% $CaCO_3$, and filter paper or cotton. The sterile inorganic medium was boiled to drive out the air, sterile filter paper or cotton was placed in a sterile bottle, and the hot medium was poured in to fill the bottle. After the medium had cooled, the inoculum, manure or garden soil, was introduced.

After incubating at 30° C. for five or six days, gas formed in the bottles and the filter paper or cotton began to fall apart. Within two weeks the fibers had separated into small fragments and settled at the bottom, and after a long period of time, decomposition of the filter paper appeared almost complete. Several transfers of the cultures were sufficient to shorten the time for appearance of gas to two or three days. Microscopic examination of these cultures showed numerous bacteria. Fibers undergoing incipient decomposition could be seen covered with bacteria. Other fibers were so far digested as to be scarcely visible in themselves, yet prominent on account of the masses of bacteria infesting them. The cultures at 20° C. were similar to those at 30° C. except that the bacteria were slower to develop.

After these preliminary tests which never failed to give cultures of cellulose-decomposing bacteria the same culture media were used with material from the termite as inoculum. The contents of the hind-gut of a termite were used for the inoculation of an anaerobic bottle containing the inorganic medium plus filter paper. There were no signs of decomposition after fifty days of incubation at 30° C. A similar bottle was prepared in which cotton was substituted for the filter paper. This also showed no signs of bacterial decomposition after fifty days.

In order to test for the presence of aerobic cellulose-decomposing bacteria in the termite gut the contents of the hind-gut of an individual of Zootermopsis nevadensis were inoculated into a flask containing a shallow layer of tapwater, .1% KNO_3, .05% $MgSO_4$, .05% K_2HPO_4, and small squares of filter paper. After one month no decomposition of the filter paper could be detected.

Another culture was similar to the preceding except that $(NH_4)_2SO_4$ was substituted for the KNO_3. No growth appeared in this culture until more than a month had elapsed when a black mold began to develop.

These first experiments indicated the absence in the termite gut of cellulose-decomposing bacteria growing at the usual rate in the usual media. Further experiments with modified culture media substantiated this conclusion.

Several anaerobic enrichment cultures were prepared and each inoculated with an entire termite, whose gut contents were squeezed out after inoculation. Two anaerobic bottles contained tapwater, peptone, .05% $MgSO_4$, .05% K_2HPO_4, 2% Ca CO_3, and filter paper. One of these bottles was incubated at 20° C. and the other at 30° C. Two similar bottles at 20° C. and 30° C. contained yeast extract instead of peptone. Two more bottles contained .1% KNO_3 as a source of nitrogen and in two others .1% $(NH_4)_2SO_4$ was used. For many months no cellulose decomposition could be detected in any of these cultures. After ten months, however, signs of destruction of the filter paper were observed in the KNO_3 and $(NH_4)_2SO_4$ cultures. Microscopic examination showed the presence of molds in the form of small filaments and spherical spores. The growth in these cultures was evidently due to the fact that air had gained access to the bottles and enabled molds to develop.

Four fermentation tubes with tapwater, .1% KNO_3, .05% $MgSO_4$, .05% K_2HPO_4, and cotton were prepared and the pH's adjusted to 2.2, 4.0, 5.4, and 6.5, respectively. Each was inoculated with the hind-gut contents of an individual of Zootermopsis nevadensis and incubated at 25° C. A slight growth of mold occurred at a pH of 4.0 but in none of the cultures was there any sign of cellulose-decomposition by bacteria.

A series of anaerobic experiments was set up using wood as the source of cellulose instead of filter paper. Strictly, this should provide a more suitable enrichment medium than filter paper since it is material in wood that is digested in the termite gut. The medium used was tapwater plus .1% $(NH_4)_2SO_4$, .05% K_2HPO_4, .05% $MgSO_4$, and Pinus radiata sawdust. This was placed in six bottles which were adjusted to pH's of 5.2, 6.0, 7.3, 8.6, 9.4, and 10.0, respectively.

In inoculating these cultures the termites were first sterilized externally by immersing them in a saturated solution of iodine in 70% alcohol for fifteen seconds, then washing in sterile tapwater before putting them in the culture bottles. After the termites were placed in the medium they were pinched with forceps in order to force some material out of the gut. Media of the same composition, as well as one at pH 4.2, were incubated under aerobic conditions after a similar inoculation with an entire termite.

After forty-three days there was no macroscopic or microscopic evidence of decomposition in any of the anaerobic bottles. Tests of pH showed that a change of as much as 1.6 pH units occurred in some bottles, but in general the acidity had not altered. No gas had formed.

After fifty days the aerobic cultures were examined. The sawdust in the center of the culture at a pH of 4.2 was held together in a circular mass but the rest was loose as in the original medium. On microscopic examination the sawdust in the center was found to be held together by a mold attacking the wood. Considerable mycelium was present and had penetrated the cell walls. The other aerobic cultures showed no sign of decomposition.

Another series of cultures was similar to the preceding except that eight anaerobic bottles and eight aerobic flasks were used with media at a pH varying from 7.0 to 8.0. These cultures showed no growth after eighty days. A species of Penicillium appeared in one of the flasks but microscopic examination indicated that it did not penetrate the wood.

There existed the possibility that the failure of bacteria to decompose cellulose in the preceding experiments was caused by a lack in the medium of materials essential for their growth. The termite gut may contain substances other than cellulose that are necessary for growth of certain cellulose-decomposing bacteria. The prepared enrichment cultures may have lacked some of these essentials and, as a consequence, cellulose digestion failed to occur not because bacteria capable of digesting the cellulose were absent but because proper conditions for their growth were not provided.

To test the above possibility the hind-gut contents of a number of termites were placed in small tubes and centrifuged at high speed in an air-driven ultra-centrifuge (Beams, Weed, and Pickels [1]). The usual electric-driven centrifuge was found inadequate to sediment the materials of the termite gut but with the air-driven instrument it was possible to separate the wood fragments and protozoa from the clear fluid which constituted about one-half the total volume.

The fluid thus obtained was pipetted off and, with wood or cotton, was used as the culture medium. About one-twentieth of a cubic centimeter in a depression slide was used for each culture. A hole was bored from one side of the slide into the depression and to this a short piece of glass tubing was sealed with de Khotinsky cement. A piece of rubber tubing with a clamp was attached and connected to a water suction pump.

The cultures were inoculated with a small amount of material from the termite hind-gut and were evacuated. Upon evacuating many bubbles escaped from the medium, indicating the presence of dissolved gas. When no more gas was liberated the culture was tightly sealed by means of the clamp.

After eighteen days the cultures were examined under the microscope for evidences of cellulose-decomposition. In the cotton culture no signs of attack were evident. Many bacteria were present but they were not clustered about the fibers, which appeared similar to fresh cotton. When the small piece of cotton was teased with forceps and a needle it was found roughly to possess as much strength as fresh cotton.

The results of the experiment in which wood was used were essentially the same as those with cotton, except that it was more difficult to determine whether the wood particles had undergone any change. The bacteria which were present did not appear to attack the wood. The presence of molds indicated that some air had entered the culture.

Aerobic cultures in depression slides containing centrifuged gut medium also gave negative results.

These experiments in which the presence of cellulose-digesting bacteria in the alimentary tract of Zootermopsis could never be demonstrated support the conclusion that such bacteria are of no importance in the digestion of cellulose within the termite.

B. Cellulose-decomposing organisms in the burrows and pellets of the Zootermopsis colony.

Although cellulose-decomposing molds are usually absent and cellulose-digesting bacteria cannot be demonstrated in the gut of individuals of Zootermopsis these micro-organisms may be of importance in the digestion of wood in the burrows and pellets of the colony.

In the course of the present investigation a number of cellulose-decomposing molds have been isolated from termite colonies which have been kept in the laboratory. These molds were usually observed as discolorations or tufts of fruiting bodies on filter paper or wood. Their power to digest cellulose was determined by inoculating them into a suitable medium containing a weighed amount of cotton, incubating, and weighing the cotton again after the molds had acted on it.

The genera of cellulose-decomposing molds isolated from colonies of Zootermopsis were determined from Clements and Shear (5). The genera and the source are giwen in table 1.

Table 1.

Genus	Source from which isolated
Stachybotrys . .	Paper in a Petri-dish colony of termites.
Cerebella	Paper in a jar containing termites.
Dematium . . .	Paper in a jar containing termites.
Fusarium	Paper in a jar containing termites.
Stysanus	Wood in a termite colony.
Chaetomium . .	Wood in a termite colony.

The occurrence of any one of these molds in Zootermopsis colonies was sporadic although Stysanus and Chaetomium were observed a number of times.

Cleveland (7) found that defaunated termites soon died if fed upon fresh filter paper but were able to survive indefinitely if fed upon filter paper that had been attacked by fungi. This was interpreted to mean that fungi performed for the defaunated termites a function similar to that accomplished by the protozoa in faunated termites. Since cellulose-decomposing fungi are present in the colony of Zootermopsis and since they have been shown in some cases to exert a beneficial effect upon defaunated termites they may play an important part in the carbohydrate nutrition of the faunated individuals in the normal colony.

Quantitative experiments have been performed in an attempt to determine the amount of cellulose digested during the passage of wood through the termite and to compare this with the amount digested by organisms outside of the termite.

A weighed amount of sawdust of Monterey pine (P. radiata) was moistened and added to each of three 125 c.c. flasks. The sawdust in flasks

number 3 was dried in an oven at 105° C. and placed in a desiccator. Sixteen individuals of Z. nevadensis were placed in each of the other two flasks and these cultures were set aside in a dark corner of the laboratory. Some of the original individuals died but others molted into alates and produced a number of young. After eighteen months all of the sawdust in culture 1 was eaten; only three of the original termites and two young ones were alive. In culture 2 some of the sawdust was still uneaten; seven of the original and twenty-one young termites were alive. In this culture the pellets could be almost completely separated from the uneaten sawdust.

Samples of the pallets of cultures 1 and 2, the uneaten sawdust in culture 2, and the sawdust in flask 3 were analyzed as follows:

The samples were dried at 105° C. to constant weight. They were then mixed with 100 c. c. of 1% NaOH per .3 gm. of sample and were heated for four hours at 100° C. The residues were collected by filtration through a fritted glass crucible, washed with water, with .2% H_2SO_4, again with water, and were dried to constant weight. They were then treated with 50 c. c. of 72% H_2SO_4 per .3 gm. of sample for forty-eight hours at room temperature. The residue and the acid were transferred to a liter beaker and water was added until the acid was diluted to a concentration of 10%. The samples were boiled on a hot plate for two hours, cooled, and the residue again collected by filtration, washed, dried, and weighed.

The results of the analyses are given in table 2.

Table 2.

	Wt. of sample in gms.	Wt. after NaOH in gms.	Wt. after H_2SO_4 in gms.	% Sol. in NaOH	% Sol. in H_2SO_4	% Insol.
pellets, culture 1 .	.535	.344	.229	35,6	21,5	42,9
pellets, culture 1 .	.465	.305	.203	34.4	21.9	43.7
pellets, culture 2 .	.434	.271	.190	37,5	18,7	43,8
pellets, culture 2 .	.391	.246	.170	37.1	19.4	43.5
uneaten sawdust, culture 2 . . .	.286	.300	.085	22.3	55.7	22.0
uneaten sawdust, culture 2 . . .	.472	.363	.100	23.1	55.7	21.2
original sawdust .	.613	.460	.128	25.0	54.2	20.8

An inspection of the last three vertical columns in table 2, shows that the fractions obtained by analysis of the uneaten sawdust are almost identical with those for the original sawdust. The wood which has passed through the termites, however, differs in composition. The insoluble fraction has almost doubled its proportion, the alkali-soluble part is also increased, but the portion soluble in 72% H_2SO_4 is greatly decreased in comparison with the values for the original and for the uneaten sawdust. This last fraction includes the cellulose of the wood. It is evident that the cellulose decomposition in the uneaten wood is negligible in comparison with that occurring in the wood passing through the termites.

It should be pointed out that the above conclusion as to the amount of cellulose digested by molds in the wood of the colony is valid only if molds exert a differential action upon the substances in wood, dissolving some to a greater extent than others. If each substance in the uneaten sawdust were dissolved by molds to the same extent, the uneaten sawdust might have been seriously attacked by molds and yet show the same composition as the original sawdust. But the experiments of Bray and Andrews (3),

Falk and Haag (11), and Campbell (4) show that molds exert a differential action on the components of wood and that wood which has been decomposed by molds has a different composition from that which is unattacked. Since in the above experiment the uneaten and the original sawdust were of approximately the same composition it may be concluded that the uneaten sawdust had been little attacked by molds during the time in which it remained in the colony.

It might appear that it could also be concluded from this experiment that molds are unimportant in the dissimilation of woody materials in the Zootermopsis colony and that the major change in the wood occurs during its passage through the alimentary tract of the termite. But it is possible that molds in the colony act upon the woody material after it has passed through the alimentary tract of the termites and that the great difference between the composition of the pellets and the uneaten wood is not due to an action during the passage of food through the termite but to the subsequent dissimilation of pellet-material by molds. An experiment was performed in order to test this possibility.

A stump of Monterey pine was split open and found to contain a colony of Z. nevadensis. One side of the stump was badly rotted by a species of Polyporus. The other side was filled with pitch. The termites occupied an intermediate portion of the stump in which the wood was somewhat decayed but still retained a large part of its original strength. This wood was traversed by extensive termite burrows in which were found numerous termites and pellets. The termites, pellets, and the wood surrounding the burrows were collected and brought into the laboratory. The pellets were dried, placed in a weighing bottle, and set aside for future analysis. The wood was carefully freed from all attached pellets and was placed in a battery jar with the termites. The pellets which accumulated were removed daily and dried. After enough of these pellets had been collected some of the wood on which the termites had been feeding was filed off, placed in a weighing bottle, and dried. The pellets collected from the stump and those collected in the laboratory were ground to a fine powder, replaced in their respective weighing bottles, and dried to constant weight. The wood, laboratory pellets, and stump pellets were analyzed, using a method similar to that employed in the previous experiment. The results of the analyses are given in table 3.

Table 3.

No. of sample	1	2	3	4	5
Material	wood	wood	lab. pellets	colony pellets	colony pellets
Wt. of sample	2.204 gm.	2.290 gm.	0.482 gm.	1.870 gm.	2.249 gm.
Wt. after NaOH . . .	1.594 ,,	1.735 ,,	0.285 ,,	1.089 ,,	1.397 ,,
Wt. after H_2SO_4 . . .	0.607 ,,	0.670 ,,	0.175 ,,	0.698 ,,	0.856 ,,
% sol. in NaOH . . .	27.7	24.2	40.9	41.8	37.8
% sol. in H_2SO_4 . . .	44.8	46.5	22.8	20.9	24.1
% residue	27.5	29.3	36.3	37.3	38.1

The pellets collected in the laboratory and those which had accumulated in the stump were formed from similar wood by the same set of termites. The difference between these batches was, however, that the latter

group had been subjected to the action of microorganisms for a considerable period of time, whereas this had been prevented in the collection of laboratory pellets. Yet, they show approximately the same composition. It may thus be concluded that pellets formed in the colony and remaining there for a considerable time do not undergo a change in composition that is at all comparable to the change the wood undergoes during passage through the termite.

These experiments show that the amount of cellulose digested by bacteria and molds in the Zootermopsis colony is quantitatively and qualitatively quite unimportant as compared with that digested within the termite.

C. Discussion.

In view of the widespread distribution and large numbers of cellulose bacteria in nature it may at first sight seem surprising that in no case were such organisms found in the Zootermopsis colonies investigated during the course of the present experiments. For it might be expected that they would find their way from the soil, air, or water into the termite burrows and either grow or survive there for some time. But the almost exclusive wood-dwelling habit of Zootermopsis isolates the termites and their burrows from the sources of infection so that cellulose bacteria probably gain only an occasional entrance. The acid reaction of wood (13, p. 479) is a factor capable of accounting for the failure of these occasional entrants to develop, for Waksman and Skinner (14) have shown that cellulose bacteria do not commonly grow in acid media.

The presence of cellulose decomposing bacteria in the colonies of Reticulitermes (10) is probably a result of the intimate association of this termite genus with the soil. The soil-burrowing habit of termites of this group has led to their designation as subterranean termites. The burrow is formed from wood particles and termite excreta intimately mixed with soil. It is to be expected that cellulose bacteria would be present in the mixture. But the mere detection of cellulose bacteria under these conditions tells little as to their possible significance in the nutrition of the termite though it does indicate the diserability of thoroughly investigating the matter. The results obtained with one species or genus of termites cannot without reservations be extended to others and it is possible that cellulose-decomposing bacteria and molds in colonies of Reticulitermes are of importance in the carbohydrate nutrition of this genus.

In the genus Zootermopsis, however, the negative results of enrichment cultures for cellulose decomposing bacteria, the scarcity of molds in the gut, and the demonstrated relative ineffectiveness of molds and bacteria in decomposing both wood and pellets in the colony show conclusively that bacteria and molds play little part in making the cellulose in wood available for these termites.

D. Summary.

1. Microscopic examination shows that molds in the alimentary tract of Zootermopsis are not sufficiently numerous to be of significance as digesters of cellulose within the termite.

2. Negative results of aerobic and anaerobic cellulose enrichment cultures designed to approximate the conditions in the alimentary tract of

Zootermopsis show that cellulose decomposing bacteria in the gut are not sufficiently numerous to be of significance in making cellulose available to the termite.

3. Quantitative analyses of wood and pellets of Zootermopsis colonies show that the amount of cellulose digested by bacteria and molds in the wood of the colony is far less than that digested during passage of wood through the termite.

Literature.

1. Beams, J. W., Weed, A. J., and Pickels, E. G., The ultra-centrifuge. Science. Vol. 78. 1933. p. 338—340.) — 2. Beckwith, T. D., and Rose, E. J., Cellulose digestion by organisms from the termite gut. (Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. Vol. 27. 1929. p. 4—6.) — 3. Bray, M. W., and Andrews, T. M., Chemical changes of groundwood during decay. (Journ. Ind. and Eng. Chem. Vol. 16. 1924. p. 137—139.) — 4. Campbell, W. G., The chemistry of the white rots of wood. (Biochem. Journ. Vol. 26. 1932. p. 1829—1838. — 5. Clements, F. E., and Shear, C. L., The genera of fungi. New York 1931. — 6. Cleveland, L. R., Symbiosis between termites and their intestinal protozoa. (Proc. Nat. Acad. Sci. Vol. 9. 1923. p. 424—428.) — 7. Cleveland, L. R., The physiological and symbiotic relationships between the intestinal protozoa of termites and their host, with special reference to Reticulitermes flavipes Kollar. (Biol. Bull. Vol. 46. p. 177—225.) — 8. Cleveland, L. R., The ability of termites to live perhaps indefinitely on a diet of pure cellulose. (Biol. Bull. Vol. 48. 1925. p. 289—293.) — 9. Cleveland, L. R., The feeding habit of termite castes and its relation to their intestinal flagellates. (Biol. Bull. Vol. 48. 1925. p. 295—306.) — 10. Dickman, A., Studies on the intestinal flora of termites with reference to their ability to digest cellulose. (Biol. Bull. Vol. 61. 1931. p. 85—92.) — 11. Falk, R., and Haag, W., Der Lignin- und Celluloseabbau des Holzes, zwei verschiedene Zersetzungsprozesse durch holzbewohnende Fadenpilze. (Ber. d. Dtsch. chem. Ges. Bd. 60. 1927. S. 225.) — 12. Omeliansky, W., Über die Gärung der Cellulose. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 8. 1902.) — 13. Schorger, A. W., The chemistry of cellulose and wood. New York 1926. — 14. Waksman, S., and Skinner, Micro-organisms concerned in the decomposition of cellulose in the soil. (Journ. Bact. Vol. 12. 1926. p. 57—84.) — 15. Winogradsky, S., Etudes sur la microbiologie du sol. IV. Sur la dégradation de la cellulose dans le sol. (Ann. Inst. Past. T. 43. 1929. p. 549—663.)

Studies on the Bacterial-Plant groups of Cowpea, Cicer and Dhaincha.

I. Classification[1]).

By M. S. Raju.

Bacteriological Assistant, Agricultural Research Institute, Coimbatore (India).

The classification of the leguminous plants, listed below together with their latin names, into the bacterial-plant groups or the so called cross-inoculation groups is not only of scientific interest but is also of much economic importance, because they are grown extensively in India and elsewhere for green manuring, and for human and cattle feeding. Unfortunately, very

[1]) Contribution from the Department of Agricultural Bacteriology, University of Wisconsin, Madison and forms part of the thesis submitted towards the partial fulfilment of the Degree of Doctor of Philosophy of the University of Wisconsin.

little information is available concerning their classification. In view of the importance of the subject, systematic work on this problem will be highly useful.

Popular name.	Scientific name.
Gram, Indian gram, Bengal gram, Chick peas.	Cicer arietinum, Linn.
Black gram, urud (Black seeded)	Phaseolus Mungo, Linn.
Cluster bean, guar.	Cyamopsis psoraloides, DC.
Cowpea	Vigna Catjang, Walp.
Dew gram, math, mat bean	Phaseolus aconitifolius, Jacq.
Dhaincha	Sesbania aculeata, Poir.
Groundnut, peanut.	Arachis hypogaea, Linn.
Horse gram, Kulthi.	Dolichos biflorus, Linn.
Green gram, mung bean (green seeded)	Phaseolus radiatus, Linn.
Indigo.	Indigofera tinctoria, Linn.
Lablab, field bean.	Dolichos Lablab, Linn.
Pillipesara.	Phaseolus trilobus, Ait.
Red gram, arhar, pegion pea.	Cajanus indicus, Spreng.
Sunnhemp, Sannhemp.	Crotalaria juncea, Linn.
Wild indigo, Kolinji, Vempali.	Tephrosia purpurea, Pers.

A recent publication by Fred, Baldwin and McCo.y (7) contains a review of literature on this subject. Simon (18), Garman and Didlake (9), Burrell and Hansen (4), Joshi (12), Gangulee (8) and Richmond (15), have all reported the results of their studies on some of the plants listed above. The limitation of the above contributions were set out clearly in the monograph of Fred et al (loc. cit.). Very little information is available on the cultural characters of the nodule bacteria of these plants. Only recently more reliable tests for the purity of nodule bacteria have been worked out (14, 2, 10). The present investigation was undertaken with a view to study the cultural characters of some of the bacteria isolated from the nodules of these plants, and also to classify these plants into various bacterial-plant groups.

Experimental Work.

The cultures used in this work were collected from three different sources.

(A) The stock cultures of the Department of Agricultural Bacteriology, University of Wisconsin.

(B) The cultures isolated by the author from the legumes of India grown on soils of India.

(C) The cultures isolated by Leonard and by Baldwin from plants grown on soils of America.

A. The Stock Cultures.

Serial No.	Culture	Host plant	Remarks
1.	Alfalfa 100	Alfalfa (Medicago sativa, Linn.)	Commercial culture isolated by Fred, 1912
2.	Red clover 209	Crimson clover (Trifolium incarnatum, Linn.)	Leonard, Washington, D. C., 1926
3.	Lotus 68	Lotus corniculatus, Linn.	Leonard, Washington, D. C., 1925
4.	Soybean 504	Manchu Soybeans (Glycine max, Merr)	Madison Soil, 1920

Serial No.	Culture	Host plant	Remarks
5.	Bean 405	Navy bean (Phaseolus vulgaris, Linn.)	Garden Soil, Mississippi, 1925
6.	Dalea 900	Wood clover (Dalea alopecuroides, Willd.)	Hill farm, Madison, 1924
7.	Dalea 901	Wood clover (Dalea alopecuroides, Willd.)	Hill farm, Madison, 1927
8.	Lupine 804	Lupinus nanus, Dougl.	Hill farm, Madison, seed form Germany, isolated by Baldwin, 1927
9.	Lupine 801	Yellow lupins (Lupinue luteus, Linn.)	Madison soil isolated by Fred, 1918
10.	Cowpea 600	Cowpea (Vigna sinensis, End.)	U. S. Old 153, Dept. Agc., 1919
11.	Cowpea 602	Cowpea (Vigna sinensis, End.)	Whiting 1926
12.	Sanfoin 79		Barthel, Sweden, 1929
13.	Black locust 69	Black locust (Robinia Pseudacacia, Linn.)	Whiting, 1926
14.	Peas 325	Alaska peas (Pisum sativum, Linn.)	Culture 311a passed through plant
15.	Peas 301		Commercial cult., 1918
16.	Peas 307	Late sweet peas (Lathyrus odoratus, Linn.)	Whiting, 1924
17.	Peas 310	Late sweet peas (Lathyrus odoratus, Linn.)	Whiting, 1924 Wisconsin Soil
18.	Bean 401		Commercial cult., 1922
19.	Bean 414		Commercial cult., Maryland, Exp. Sta., 1928
20.	Lupine 806	Lupinus nanus, Dougl.	805 culture passed through Lupinus albus, Linn., 1928
21.	Lupine 808		804 culture passed through Lupinus albus, Linn.

These cultures represent the important type cultures of different bacterial-plant groups, already described by other investigators. The purity of these cultures was tested by the staff of this department periodically and was found to be correct. The author also verified the purity of some of these strains and found it to be correct.

B. Cultures of Indian Origin.

Culture	Host plant	Remarks
Dew gram 34	Dew gram (Phaseolus aconitifolius, Jacq.)	Coimbatore, India, 1930
Red gram 39	Red gram (Cajanus indicus, Spreng)	,, ,, ,,
Black gram 1. P.	Black gram (Phaseolus Mungo, Linn.)	* Madison, U.S.A., 1931
Black gram 2. P.	Black gram (Phaseolus Mungo, Linn.)	* ,, ,, ,,
Lablab 1. P.	Lablab (Dolichos Lablab, Linn.)	* ,, ,, ,,
Horse gram 1. P.	Horse gram (Dolichos biflorus, Linn.)	* ,, ,, ,,
Gram I	Gram (Cicer arietinum, Linn.)	* ,, ,, ,,
Gram II	,, ,, ,, ,,	+ ,, ,, ,,

Culture	Host plant	Remarks
Dhaincha 1. P.	Dhaincha (Sesbanea aculeata, Poir.)	* Madison, U.S.A., 1931
Dhaincha 52. P.	Dhaincha (Sesbanea aculeata, Poir.)	Coimbatore, India, 1930
Dhaincha 27. P.	Dhaincha (Sesbanea aculeata, Poir.)	,, ,, ,,
Dhaincha 10. P.	Dhaincha (Sesbanea aculeata, Poir.)	,, ,, ,,
Dhaincha 11. P.	Dhaincha (Sesbanea aculeata, Poir.)	* Madison, U.S.A., 1931
	C. Cultures of American Origin.	
Cicer 67	Cicer arietinum, Linn.	Leonard, Washington, 1925. Seed coat D.C. grey & size big
Mat bean 1	Mat bean (Phaseolus aconitifolius, Jacq.)	++ Baldwin, Madison, U.S.A.
Mung bean 2	Mung bean (Phaseolus aureus, Roxb. = P. Mungo, Linn.)	++ Baldwin, Madison, U.S.A.
Crotalaria 2	Crotalaria anagyroides, H. B.	++ Baldwin, Madison, U.S.A.

* Plants grown in the green house under controlled condition; used dry land soil from Coimbatore, India, as an inoculum.
\+ Plants grown in the green house under controlled conditions, used garden land soil from Coimbatore, India, as an inoculum.
++ Plants grown at the Hill Farm, Madison, Wisconsin (U.S.A.).
P. Passed through the host plant for purification.

Methods of Isolation and Purification.

B. The cultures of Indian origin.

Unless stated otherwise, the cultures were isolated from the young nodules formed on the tap roots of plants grown under field conditions. The surface of the nodules was sterilised with mercuric chloride solution of 1 in 1,000 dilution, washed several times with sterile water and crushed in a sterile mortar. This material was enriched on soil-extract mannitol solution (1) for one week and was plated on soil extract mannitol agar several times for purification. The pure culture was finally sub-cultivated on slants. Some of the cultures which were quick growing, gummy and rough surfaced were inoculated on their original host plants under the controlled conditions in the green house at Madison, Wisconsin and the nodules formed on the tap root were plated according to the technique described by Fred and Waksman (6). In this way the cultures were purified.

Some of the cultures isolated at Madison, were from the nodules produced in the green house with a fertile soil from India. The technique as described by Fred and Waksman (loc. cit.) was used for the isolation and purification of these cultures.

C. The cultures of American Origin.

All the cultures listed under this head were purified by the author and were tested for purity and for nodule production on their host plant.

Tests of purity: The tests of Löhnis and Hansen (loc. cit.) on potato slant and litmus milk, of Baldwin and Fred (loc. cit.)

on from thymol blue yeast, water mannitol agar slants, of Hofer and Baldwin (loc. cit.) on veal-broth and of Smith (19) on glycerol crystal-violet agar, were used to establish the purity of the cultures. They were also tested for nodule production on their original host plants or some other closely allied species.

The veal broth was prepared by adding 500 c.c. of distilled water to 1 lb. of ground veal free from fat. To remove the sugar, this was seeded with E. Coli. After 12 hours of incubation at 37^0 C., it was autoclaved at 15 lb. pressure for 20 minutes and filtered over cotton wool. 500 c.c. of peptone water containing 10 gms. of peptone and 3 gms. of sodium chloride were added. The volume was made up to one liter and adjusted the reaction to pH 7.0 with NaOH. It was tubed and autoclaved in the usual manner.

The cultures bear the common name of their original host plant.

The results of these tests are presented in table 1.

Table 1. Showing the results of the tests of purity of the nodule bacteria of Cowpea, Cicer and Dhaincha groups.

Culture	Litmus milk	Veal broth	Brom Thymol blue mannitol agar plant	
Dew gram 34	—	—	A	++
Red gram 39	+	+	A R	+++
Black gram 1. P.	—	—	A	+++
Black gram 2. P.	—	—	A	+++
Lablab 1. P.	+	+	N	+++
Horse gram 1. P.	S +	+	A R	+++
Mat bean 1	—	—	A	++
Mung bean 2.	—	+	A	++
Crotalaria 2	S +	—	N	++
Gram I	—	—	A	+++
Gram II	—	—	N	+
Cicer 67	S +	++	N	+++
Dhaincha 1. P.	A —	?	N	+++
Dhaincha 52. P.	—	—	A	+++
Dhaincha 27. P.	A —	—	A	+++
Dhaincha 10. P.	S +	+	N	+++
Dhaincha 11. P.	—	?	N	+++

+++ Heavy growth; ++ moderate growth; + slight growth; ? trace of growth; — no growth or no visible change.

R very slightly rough surface; S narrow serum zone; N neutral in reaction; A alkaline in reaction.

The results presented in table 1 show that these cultures are quite pure. They, however, exhibit variations in their cultural characteristics.

These cultures did not show the presence of any colonies characteristic of radiobacter on glycerol crystal-violet agar. They did not grow on potato except the cultures, gram II and Cicer 67, which showed only a trace of growth. The majority of the cultures failed to produce any visible change on litmus milk. Only a few cultures produced slight serum zone. The majority of the strains produced no growth on veal broth, while some produced a slight or a moderate growth. Many produced alkalinity on Brom thymol blue mannitol agar slants. Some failed to change the reaction.

All the cultures produced nodules on their host plant.

The Cross-inoculation studies.

The root nodule bacteria of the Leguminosae fall into several distinct bacterial plant groups or the so called cross-inoculation groups on the basis of their host specificity. These groups were previously considered to be not related to one another. The recent work (13, 16, 17) shows, however, that (1) the host specificity extends beyond the limits of a single bacterial-plant group. (Some strains of soybean organisms) and (2) the factors which reduce the photosynthetic activity of the host plant prevents the nodule production even though the host specificity exists between the strain of the nodule bacteria and the variety of the leguminous plant. It may be said, therefore, that the negative results will be misleading in the cross-inoculation tests, if the environmental factors are not favourable for the nodule production.

The cross-inoculation tests reported here, were therefore conducted in the green house at Madison, during all the three growing seasons viz., spring, summer and autumn. The negative results were considered to be significant for the purpose of classification only when they were negative during all the three seasons. The details of the dates of inoculation and examination for the nodules were presented here so that the degree of the significance of the resluts may be judged.

Method. All the varieties of seeds of the legumes listed above were brought from India, except red gram, which was from California. Their surface was sterilised in 6.6% calcium hypochlorite solution for one hour. Three varieties of seeds were sown together in ½ gallon jars filled with brown sand of a very low nitrogen and organic matter contents. The jars with sand were sterilised in an autoclave at 15 lb. pressure per square inch for 12 hours. The sand was moistened with the modified Sterile Crone Solution (3) at the time of planting. The seeds, before covering with sand, were inoculated with a suspension of the strain of nodule bacteria under consideration after 4 to 7 days of growth on yeast-water mannitol agar slant (6). Three jars were inoculated with every culture and one was left without inoculation to serve as a control. They were moistened with sterile distilled water whenever necessary. The jars were washed after about a month's growth and the plants were examined for microscopic nodules.

The results were considered conclusive only when all the three jars of a single treatment gave concordant results, and when the controls were free from nodules. The general growth of the plants was also closely observed.

Light. The solar radiation varied from 7,000 to 17,400 gram calories during March to October, when most of the experiments were conducted.

The growth of the plants was normal during April to October as judged by their general appearance. From October to December the growth was slow. The leaves of most of the plants without nodules, turned pale within 18 days after planting when the season was most favourable for plant growth. When the light was deficient, this period was prolonged. The controls of groundnut required 45 days for their leaves to become pale, probably due to the high protein reserve in their seeds. The controls of pillipesara, indigo and wild indigo also failed to show pale leaves within 30 to 45 days, probably due to their slow growth. In general, mention may be made that the number of days required for the controls of any particular variety of plant, to show the signs of nitrogen starvation when the other minerals were supplied in optimum quantities, or for the appearance of the true leaves, were shorter when the plant growth was more favourable.

The cultures, Lotus 68, Red clover 209, Black locust 69, Alfalfa 100, Sanfoin 79, Peas 325, and Bean 405 were also inoculated along with the cultures shown in table 2. They did not produce nodules on any of the plants

tried. They were again inoculated on horse gram, cowpea, lablab, green gram on September 1st, 1931. The plants were examined for the nodule production after 31 days. They did not produce any nodules this time either. They were inoculated on sunnhemp, cowpea and cluster bean plants on June 24, 1932. The plants were examined for nodules after 24 days, but no nodules could be found. The plants listed above do not cross-inoculate with any of these cultures, hence they belong to a different bacterial-plant group.

Table 2. * Showing the nodule production on the plants of the cowpea group by some varieties of nodule bacteria.

Plant	Planted	Examined after	Cowpea 600	Dew gram 34	Red gram 39	Dalea 901	Lupine 801	Soybean 504
	1931	days.						
Sunnhemp . .	May, 23	33	+	?	—	—	—	—
Cluster bean. .	Do.	33	—	++	+	+	?	—
Green gram. .	June, 3	31	+	++++	+	+	+	—
Horse gram . .	July, 11	32	—	++	—	—	—	—
Dew gram. . .	Do.	32	—	++++	—	—	?	—
Pillipesara . .	June, 3	31	?	++++	+	+	+	—
Black gram . .	July, 16	34	++	++++	?	?	?	+++
Indigo.	Do.	34	++	++++	?	?	?	++
Lablab. . . .	July, 19	33	+	+++	?	?	?	?
Cowpea . . .	Jul,y 16	34	++++	++++	?	?	?	+++
Red gram. . .	Oct., 21	33	++++	+++	?	?	?	++++
	1932							
Wild indigo . .	Apr., 19	17	++	++	—	—	—	—
Groundnut . .	June, 24	24	—	+++	—	—	++	—

— No nodules.
? Only very few plants contained nodules and many plants without any.
+ Very few, small or abortive nodules. (Very small oval shaped nodules with mattening of the root hairs.)
++ Few nodules.
+++ Moderate nodules.
++++ Good nodules on tap root.
* Those varieties of nodule bacteria which did not produce nodules on any of the plants listed above are not shown in this table.

Table 3. Showing the nodule production of some plants of cowpea group by some varieties of nodule bacteria.

Sown on September 1, 1931 and examined after 31 days.

Plants	*Dalea 901 and 900	*Lupine 801 and 804	Soy bean 504
Lablab	+	++	—
Green gram	+	+	+
Cowpea	?	++	++
Cluster bean	—	?	
Indigo	—	++	+
Black gram	+	+	

The symbols used here represent the same as in table 2.
* Since the results obtained by two cultures are identical, they are shown under the same column.

Table 4. Showing the nodule production on the plants of cowpea group by some varieties of nodule bacteria.

Plants	Planted on May 16, 1932			Planted on October 27, 1932			
	Examined after 33 days.			Examined after 48 days.			
	Lupine 801	Dalea 901	Soybean 504	Lupine 801	Lupine 804	Dalea 900	Dalea 901
Horse gram	+++	—	—	+	+	—	—
Black gram	—	—	—	+	?	—	—
Lablab	++	+	—	—	?	—	—
Wild Indigo	—	—	+				
Dew gram	++	—	+	?	++	—	—
Pillipesara	—	—	—	—	?	—	?
Red gram.	+++	—	+++	+++	+++		—
Green gram	++	+	++	+	+	++	—
Indigo	+++	—	+++	++	?	—	—
Cowpea	+++	++		+++	+++	—	++
Cluster bean				—	—	—	—
Sunnhemp.				—	—	—	—

The symbols used here indicate the same as in table 2.

The cultures, Dew gram 34 and Red gram 39, produced nodules on all the plants listed in table 2. The culture, cowpea 600, also produced nodules on all except cluster bean, horse gram and dew gram during the summer of 1931, and groundnut during the summer of 1932. These results show the variations in the infective power of different strains of nodule bacteria to produce nodules on different varieties of host plants of the same group. Hence, another culture, cowpea 602, was inoculated on horse gram, red gram, cowpea and cluster bean on June 24, 1932. The plants were examined after 24 days for the nodule production. The culture formed good, few, and moderate nodules on the respective host plants.

On June 24, 1932, sunnhemp plants were inoculated with the cultures, cowpea 602, red gram 39, and cowpea 600 and were examined for the nodule production on July 18, 1932. The culture, cowpea 602, produced a moderate amount of nodules, while the other two cultures produced very few nodules or none at all. As the nodule production on sunnhemp plants was not satisfactory with some of the culture of nodule bacteria of the cowpea group, the cultures, crotalaria 2, dew gram 34, mat bean 1 and black gram 2 were inoculated on August 2, 1932. When the plants were examined for the nodule production on September 3, 1932 it was observed that they produced very few, very good, few, and very few nodules respectively.

The cultures of lupine produced some nodules on many of the plants tested. The cultures, Lupine 806 and 808 were inoculated on cowpea, horse gram, red gram and green gram on October 27, 1932. They were examined after 48 days for the nodule production. All these cultures produced nodules. The results of these experiments show that the lupine cultures produce nodules on horse gram, red gram, indigo, cowpea, green gram, lablab and dew gram. They did not produce nodules on sunnhemp and wild indigo.

The nodule bacteria of dalea produced some abortive nodules on green gram in all the tests except one; only very few nodules in many of the tests made on cowpea and lablab. They did not produce nodules in any of the tests made on sunnhemp, horse gram, dew gram, wild indigo and groundnut.

The culture, soybean 504, produced nodules on cowpea, red gram and indigo plants in all the tests made and on green gram in 2 out of 3 tests. It failed to produce nodules on horse gram, pillipesara, sunnhemp, cluster bean and groundnut.

The cultures of the cowpea group reported here, differ widely from the old types in their cultural characteristics. Some of these cultures produced a moderate growth on brom thymol·blue mannitol agar slants, while others produced a heavy growth. Some were opaque, while others were translucent. They produced smooth, moist, shiny growth with the exception mentioned below. The culture, dew gram 34, differed only in possessing comparatively a dry surface on 15 days old yeast-water mannitol slants. The cultures, red gram 39 and horse gram 1 P. differed in having a very slight rough surface. They produced considerable amount of gum and a broad streak unlike the old types of cowpea bacteria.

The 7 days' old colonies (30° C) of those cultures which produced only a moderate growth on mannitol agar were opaque, 3 to 5 mm. in diameter and comparatively less gummy than the quick growing type. Their surface was smooth. The quick growing types produced translucent big and gummy colonies, 5 to 15 mm. in diameter. Their surface was smooth, shiny and slightly raised. The colonies of those types which produced a very slight rough surface resembled the quick growing types in many respects, except that they showed slightly more opaque narrow inner zone with a translucent outer zone. The cultures of nodule bacteria isolated by Baldwin resembled closely the strain dew gram 34, which produced a moderate growth except that the surface of the former was more moist. The cultures, cowpea 600 and 602, which are the stock cultures of the Department of Agricultural Bacteriology, University of Wisconsin, resembled closely the types described by Burrell and Hansen (4).

As the cultures of lupine, dalea and soybean produced nodules on some of the plants which belong definitely to the cowpea group, experiment were made to test whether any of the nodule bacteria isolated from these plants could produce nodules on soybean, dalea and lupine plants. The cultures, black gram 1 and 2, red gram 39, Mung 2, Mat bean 1, Dew gram 34, Horse gram 1 and lablab 1 were inoculated on Vigna sinensis, End., Lupinus hirsutus, Linn., Glycine max, Merr., Robinia Pseud-acacia, Linn., Pisum sativum, Linn., Trifolium pratense, Linn., Dalea alopecuroides, Willd., Sesbania aculeata, Soir., Cicer arietinum, Linn. on April 19, 1932. The plants were examined on May 6, 1932 for the nodule production. They failed to produce nodules on any of these plants except on cowpea (Vigna sinensis, End.). This establishes definitely that these cultures belong to the cowpea group.

Cicer group.

In the first test, the small seeded brown variety from India was used, and in the subsequent tests, the large seeded grey variety sold in Madison, Wisconsin, was used.

On July 11, 1931, the gram plants were inoculated with the following varieties of nodule bacteria: Alfalfa 100, Red clover 209, Lotus 68, Soybean 504, Bean 405, Dalea 901, Lupine 801, Cowpea 600, Sanfoin 79, Black locust 69, Peas 325, Dew gram 34 and Red gram 39. The plants were exa-

mined for the presence of nodules after 32 days of growth, but no nodules were found. Simon (18) claimed that it belongs to the pea group, while Joshi (12) found that it does not cross-inoculate with Phaseolus or peas. From his experiment the latter investigator suggested that "we may have to add one more species as the organism from Cicer arietinum has not been found to cross-inoculate Phaseolus and pea and vice versa" (loc. cit. p. 259). Since variations exist in the infective power of different strains of nodule bacteria, it may be possible that the strain, peas 325, is not sufficiently infective on gram plants. So the cultures, peas 301, 307, 310 from the pea group, cowpea 600, 602, red gram 39 from the cowpea group, and cicer 67, a strain isolated from gram plants, were inoculated on gram plants on August 25, 1931, and were examined on September 15, 1931 for the nodule production. None of the cultures produced nodules except cicer 67. It may be possible that other cultures might have failed to produce nodules for want of a favourable amount of light as observed in the preceding experiment. Hence, all the nodule bacteria of the different groups as listed in the first part of this experiment and also gram I, II and Cicer 67 from gram plants were inoculated on gram plants on October 22, 1931 and April 8, 1932. They were examined after 27 to 33 days. In both the repetitions, all the other groups of bacteria failed to produce any nodules except by the organisms of the Cicer group.

The cultures of this group (Gram I, II and Cicer 47) produced colonies of 5 to 10 mm. in diameter, translucent, moderate to quick growing and also vary to some extent in their gummy nature. The slant growth also varied in its width and its ability to change the reaction of the brom thymol blue mannitol agar slants (table 1).

Sears and Clark (17) showed that non-reciprocal crossing exists between Bean and Dalea. So, it may be possible that the gram plant may not produce nodules when inoculated with the other groups of nodule bacteria, while its cultures may produce nodules on the host plants of the other groups. Hence, the gram cultures were inoculated on March 16, 1932 and April 19, 1932, on the leguminous plants of India as listed before and also on one representative variety of plants of various other bacterial plant groups available.

The plants Black locust (Robinia Pseud-acacia, Linn.), Bean (Phaseolus vulgaris, Linn.), Alfalfa (Medicago sativa, Linn.), Lupines (Lupinus hirsutus, Linn.), Peas (Pisum sativum, Linn.), Soybeans (Glycine max, Merr.), Red clover (Trifolium pratense, Linn.), Cowpea (Vigna Catjang, Walp.) and Dalea (Dalea alopecuroides, Willd.) were examined after 22 days. None of these cultures produced nodules on any of the plants except gram. The cultures, black gram 1, black gram 2, Mung 1, Mat bean 1, Dew gram 34, were inoculated on gram plants on April 19th, 1932. The plants were examined for the nodule production. on May 6, 1932, but no nodules were found on any of the plants.

Dhaincha group.

The information available on dhaincha is very meager. Joshi (loc. cit.) observed that the nodule bacteria of dhaincha could not produce nodules on peas, math and gram. The dhaincha plants were inoculated on October 21, 1931, with the different varieties of nodules bacteria as described in the

previous experiment. They were examined for the nodules after 33 days. None of the cultures produced nodules. These tests were repeated on April 19, 1932, and the plants were examined for nodules after 17 days. None of the cultures produced any nodules. Some other strains of bean bacteria, Bean 401 and 414 and the strains of dhaincha organisms listed were inoculated on August 25, 1932. The plants were examined after 31 days for nodules. None of the bean cultures produced any nodules, but all the dhaincha cultures produced good nodules.

All the cultures of Dhaincha bacteria produced a heavy opaque to translucent, moist and smooth growth on yeast-water mannitol agar slants. They produced moderate amount of gum which was not very viscous.

The cultures dhaincha 52 P, 27 P and 1 P were inoculated on June 24th and October 26th, 1932 on all the leguminous plants tried in the preceding experiment except Lupinus hirsutus, Linn., since, its seeds failed to germinate. The plants were examined for nodules after 24 to 50 days. The nodules were found on dhaincha by its own culture, and also to some extent on cowpea, pillipesara and horse gram. The other plants did not produce any nodules.

Since the dhaincha culture produced few nodules on some plants of the cowpea group, the nodules formed on cowpea plants with the dhaincha cultures were collected separately. Their surface was sterilized in mercuric chloride solution 1 : 1000 for 5 minutes. They were crushed in sterile water, and were inoculated on dhaincha and cowpea plants on August 25, 1932. They were examined for nodules after 31 days. The cowpea plants produced few nodules and the dhaincha plants produced good nodules. The tests were repeated with the cultures, dhaincha 1, 10, 27, and 52 on cowpea and dhaincha plants on August 25, 1932. The plants were examined for nodules after one month. The dhaincha plants produced moderate or good nodules while cowpea plants produced few nodules. These results show that dhaincha belongs to a separate bacterial plant group, yet closely related to the cowpea group alone.

Discussion and Conclusion.

No single test of purity for the nodule bacteria is absolutely reliable. The absence of growth on potato slants is of diagnostic value. The growth on litmus milk is also reliable, though there are some strains which produce a very thin zone of serum. The reaction on veal broth is slightly more variable since some strains showed slight growth.

Several strains of the nodule bacteria were isolated from the plants of cowpea, cicer and dhaincha groups. They exhibited variations in the following cultural characters: (table 1) The speed of growth of the colonies or slants, the size and the appearance of the colonies, the surface of the slant growth on yeast-water mannitol agar, the ability to produce alkalinity on brom thymol blue mannitol agar slants, the gummy nature of the colonies and the streak growth on slants and the production of a very thin zone of serum on litmus milk.

Based upon the variations in their cultural characters, three new types in addition to the old ones are recognizable within the nodule bacteria of the cowpea group. They exhibit wide variations in their cultural characters.

Two types were recognized originally among the nodule bacteria of the cicer group, but unfortunately on January 16, 1933, when the nine weeks

old yeast-water mannitol slant was subcultivated, the slow growing type became a quick growing type in many respects.

The nodule bacteria of dhaincha group showed lesser variations in their cultural characters than the preceding two groups.

Only further work on their biochemical characters may reveal the significance of some of the variations described above.

The results of the plant inoculation tests show that all the leguminous plants listed above except gram and dhaincha belong to the cowpea group. This confirms the results of Burrell and Hansen (4) on groundnut and cowpea and Richmond (15) on lablab, black gram, green gram, cluster bean and horse gram. The pea group is entirely distinct from that of cowpea as pointed out by several workers except Joshi.

Some varieties of plants produced nodules at least during certain seasons, when inoculated with the organisms of soybean, lupine, dalea, and the dhaincha groups, though reciprocal crossing did not occur under the conditions of the experiment. This confirms some of the observations of the previous workers (13, 16) on the soybean and cowpea groups. All the other groups of bacteria did not produce nodules on the plants of cowpea group.

It is interesting to note that the culture, cowpea 600, failed to produce nodules on the cluster bean, horse gram and dew gram in August 1931, probably due to an excess of light. It was a poor strain on many of the host plants tried except on red gram, and to some extent on cowpea plants. Many other strains of nodules bacteria of this group failed to produce nodules on sunnhemp. More recently, Carroll (5) reported similar observations on various species of crotalaria. The cowpea group is the most complicated of all the bacterial-plant groups known so far. The plants of this group produced nodules by the bacteria of some other groups. The bacteria of this group were unable to infect the host plants of other groups. Some of their strains of nodule bacteria were unable to produce nodules even on some varieties of the host plants of the same group. They were easily influenced by the unfavourable light. They seem to be more delicate and specialized in their host plants for nodule production than any other known bacterial-plant group.

The cowpea group bears two kinds of relationship towards the other bacterial-plant groups:

(1) Closely related to the following as far as the nodule production, is concerned;
Soybean, Lupine, Dalea and Dhaincha.

(2) All other groups not mentioned in (1).

No correlation was observed between any definite set of cultural characters and the nodule producing capacity of any particular strain of nodule bacteria.

The results of plant inoculation studies for the nodule production show that the plants of gram can form nodules only by the nodule bacteria isolated from their own nodules. The organisms from gram nodules cannot produce nodules on other bacterial-plant groups. These observations disprove the view held by Simon and prove definitely that the gram belongs to a distinct bacterial-plant group by itself.

The dhaincha plants produced nodules only by the nodule bacteria isolated from their own nodules. The nodule bacteria isolated from the

nodules of dhaincha, however, produce nodules on some plants of the cowpea group. Hence, dhaincha is proved to be a separate bacterial-plant group, although their organisms are somewhat related to the cowpea group alone. The other bacterial-plant groups are not at all related to the dhaincha group.

Summary.

(1) Some strains of nodule bacteria were isolated in pure cultures from the plants of cowpea, gram and dhaincha groups.

(2) Based upon the variations in the cultural characters, three new types are recognizable among the nodule bacteria of the cowpea group.

(3) As a result of plant inoculation studies, black gram, cluster bean, cowpea, dew gram, groundnut, horse gram, green gram, indigo, lablab, pillipesara, red gram, sunnhemp and wild indigo were found to belong to the cowpea bacterial-plant group.

(4) The cultures of Lupine, Dalea, Soybean and dhaincha groups are somewhat related to the cowpea group, though the cowpea organisms cannot produce nodules on the plants of these groups.

(5) Wide variations in the infective power of nodule bacteria of the cowpea group were observed on different varieties of host plants of the same group.

(6) Gram and dhaincha were found to be two new bacterial-plant groups.

(7) The cicer group is entirely distinct from the other groups, while dhaincha is somewhat related to the cowpea group.

Acknowledgments.

The author wishes to thank Professors E. B. Fred and I. L. Baldwin for the facilities given and for their helpful advice in the course of the work and Messrs. B. Viswa Nath and P. D. Karunakar, the then Government Agricultural Chemist and Agricultural Bacteriologist respectively of the Agricultural Research Institute, Coimbatore, India, for supplying the seeds of dhaincha and wild indigo from India.

Addenda.

(1) After preparing this paper for publication (11) the following publications appeared. Rasumowskaja reported in Zentralbl. f. Bakt., Abt. II. Bd. 90 (August 10, 1934). S. 330—335 that Cicer arietinum, Linn. did not form nodules by the nodule bacteria of the pea and vetch, but formed nodules by its own bacteria. The results of the present writer's work carried in Prof. E. B. Fred's laboratory were recorded by Fred et al (loc. cit.).

Rasumowskaja apparently did not notice this reference to the earlier work on the subject. Further, the work of Rasumowskaja was confined to the inoculation of Cicer arietinum plants with the crushed nodules of Vicia sativa, Vicia Cracca and Pisum sativum and pure cultures of nodule bacteria of pea and vetch only, whereas the present work forms an extensive study on the subject [vide: M. S. Raju, Science (N. S.). Vol. 81. (June 28, 1935.) p. 639].

(2) Walker and Brown reported in Soil Science. Vol. 39 (March, 1935). p. 221—225 that the bacteria producing nodules on the roots of soybeans and cowpea should be considered as belonging to the same species. The inability of the cowpea organisms to produce nodules on soybean and

certain strains of soybean organisms on cowpea was explained on the basis of biological variations of the strains of bacteria within the species. As the soybean organisms were named by Kirchner in 1895 as Rhizobium japonicum, the above authors suggested that the cowpea organisms should also receive the same name.

The author does not agree with the suggestions of Walker and Brown due to the following reasons.

(1) Only some of the strains of soybean organisms were able to produce nodules on some species of host plants of the cowpea group but not by all the strain on all the members of the cowpea group.

(2) Not only the soybean organisms, but also the organisms of lupine, dalea and dhaincha were able to produce some nodules at least on some members of the cowpea group.

(3) None of the organisms of the cowpea group could produce nodules on any of the soybean, lupine, dalea or dhaincha plants in any of the tests reported here.

This is a definite character of the organisms of cowpea group for host specificity while the organisms of soybean, lupine, dalea and dhaincha are closely related to the cowpea group but not identical with it.

No doubt, the organisms of cowpea group exhibited variations in their cultural characters and in their ability to produce nodules on different members of the same group, especially on sunnhemp etc., but all of them were able to produce nodules on almost all of the host plants of eowpea group at least under favourabie eonditions of light.

Bibliography.

1. Ashby, S. F., Journ. Agr. Sci. Vol. 2. 1907. p. 35—51. — 2. Baldwin, I. L., and Fred, E. B., Soil Sci. Vol. 24. 1927. p. 217—230. — 3. Bryan, O. C., Soil Sci. Vol. 13. 1922. p. 271—302. — 4. Burrill, T. J., and Hansen, Roy, Ill. Agr. Exp. Sta. Bul. Vol. 202. 1917. p. 115—181. — 5. Carroll, W. R., Science (n. S.). Vol. 76. No. 1957. 1932. p. 15 (July 1, 1932). — 6. Fred, E. B., and Waksman, S. A., Lab. Manual of General Microbiology. p. 106—107. New York (McGraw-Hill Book Co. Inc.) 1928. — 7. Fred, E. B., Baldwin, I. L., and McCoy, E., Univ. Wis. Studies Sci. Ser. No. 5. 1932. p. 1—343. — 8. Gangulee, N., Ann. Appl. Biol. Vol. 13. 1926. p. 256—259. — 9. Garman, H., and Didlake, M., Ky. Agr. Exp. Sta. Bul. Vol. 184. 1914. p. 343—363. — 10. Hofer, A. W., and Baldwin, I. L., Journ. Bact. Vol. 23. 1932. p. 66—67. — 11. Hooker, J. D., and Jackson, B. D., Index Kewensi Plantarum Phanerogamarum. Vol. 1. 1893—95. p. 1—728; Vol. 2. p. 729—1268; Vol. 3. p. 1—640; Vol. 4. p. 641—1299. Suppl. Vol. 6. p. 92, 1916—20. Oxonii E Prelo Clarendoniano. — 12. Joshi, N. V., Mem. Dept. Agr. India Bact. Ser. Vol. 1. 1920. p. 247—276. — 13. Leonard, L. T., Soil Sci. Vol. 15. 1923. p. 277—283. — 14. Löhnis, F., and Hansen, Roy, Journ. Agr. Res. Vol. 20. 1921. p. 543—556. — 15. Richmond, T. E., Journ. Amer. Soc. Agron. Vol. 18. 1926. p. 411—414. — 16. Sears, O. H., and Carroll, W. R., Soil Sci. Vol. 24. 1927. p. 413—419. — 17. Sears, O. H., and Clark, F. M., Soil Sci. Vol. 30. 1930. p. 237—242. — 18. Simon, J., Centralbl. f. Bakt. etc. II. Abt. Bd. 41. 1914. p. 470—479. — 19. Smith, N. R., Journ. Bact. Vol. 15. 1928. p. 20—21.

Referate.

Bücher, Institutsberichte usw.

Oppenheimer, C. und Pincussen, L., Tabulae Biologicae Periodicae. Bd. 5, Nr. 1 u. 2. Den Haag (Verlag W. Junk) 1935. Preis des kompl. Bandes 55.— RM. (Subskriptionspreis 48.— RM.)

Die vorliegenden Hefte enthalten folgende Beiträge: Th. A. Maaß, Über-Empfindlichkeit; Red., Chemische Bestandteile des Fetal-Blutes; W. Franke, Wärmetönungen und maximale Nutz-Arbeiten biochemisch wichtiger Reaktionen; L. Pincussen, Sichtbarkeit des U. V. für das menschliche Auge; K. Boresch, Gehalt der Pflanzen an Mineralstoffen II und III; O. Reitz, Daten über das schwere Wasser; H. Stitz, Formicidae.

Es mag nochmals gesagt sein (vgl. Referat über Bd. 3 u. 4, diese Zeitschrift Bd. 94, 1936, S. 177), daß diese in tabellarischer Kürze zusammengefaßten Darstellungen von jedem Biologen begrüßt werden, ersparen sie doch mühsames und zeitraubendes Nachschlagen in zahlreichen Originalarbeiten. Stapp.

Meer Mohr, J. C. van der, Verslag van het Deli-Proefstation over het jaar 1934. [Bericht der Deli-Versuchsstation im Jahre 1934.] (Meded. v. h. Deli Proefstation te Medan. Tweede Serie. No. XCII.)

Die botanische Abteilung der Versuchsstation (S. 15—23) berichtet über das Vorkommen der Mosaikkrankheit („peh sim"). Hierüber wird demnächst eine ausführliche Publikation von Dr. Jochems erscheinen. Zur Bekämpfung der Krankheit sollen infizierte Saatbeete sofort entfernt und die jungen Pflänzchen („bibit") vernichtet werden; einzelstehende befallene Pflanzen sollen entfernt und verbrannt, größere Komplexe umzäunt werden. Sofern das Personal mit den kranken Pflanzen in Berührung gekommen ist, soll es die Hände mit 5 proz. Formalin reinigen.

Bei den ernährungsphysiologischen Versuchen mit Tabakkeimlingen sind noch Schwierigkeiten zu überwinden, jedoch ist es schon gelungen, in Wasserkulturen fast normale Pflänzchen zwecks weiterer Prüfungen zu kultivieren.

Zur Untersuchung wurden im ganzen 300 Tabakmuster eingesandt.

van Beyma thoe Kingma (Baarn).

A. V. R. O. S., Algemeen Proefstation der, Bericht über das vergangene Jahr (Juli 1934 — Juni 1935).

Der phytopathologische Teil erwähnt u. a. folgende Krankheiten:

Hevea: Ganoderma pseudoferreum wurde häufig an Heveawurzeln gefunden. „Mouldy rot" breitet sich noch immer aus. Bekämpfung durch Karbolineum oder Kohlenteer-Petroleum. Eine Gipfelfäule wurde verursacht durch Botryodiplodia theobromae, nachdem die Bäume durch einen schweren Milbenbefall stark geschwächt worden waren. Die Bekämpfung hat sich in erster Linie gegen die Milben zu richten. Eine Blattfallkrankheit wurde durch Oidium verursacht und bekämpft durch Bestäubung mit Schwefel.

Ölpalme: Hier wurde eine unbekannte Krankheit beobachtet, wobei die Stämme im Innern hohl und angefault waren, ohne daß jedoch das Vordringen der Krankheit von außen her verfolgt werden konnte. Um die befallenen Stellen herum war das Holz gelb verfärbt, von da an wurde

es immer dunkler, die zentralen Stellen waren ganz schwarz. Ein Pilz konnte nicht isoliert werden, so daß einstweilen anorganische Einflüsse angenommen werden.

Auch Fomes noxius verursachte häufig Stammfäule.

van Beyma thoe Kingma (Baarn).

Allgemeines und Methodisches.

Schreiber, W., Eine neue Mikroskopierlampe für Beobachtung bei künstlichem Tageslicht. (Münch. med. Wochenschr. Jahrg. 82. 1935. S. 1407—1408.)

Die von der Nova-Lux G. m. b. H., Köln, auf Anregung Verf.s konstruierte Lampe stellt eine Spiegelleuchte dar mit kegelförmigem, schräg abgeschnittenen Bakelitschirm, dessen längere Seite zum Zweck der Abschirmung oben liegt. Die Leuchte wird durch ein bewegliches Stativ mit rundem Eisenfuß getragen. Das Stativ ist mit Gelenkarm versehen, der durch Flügelschrauben feststellbar ist. Der Strahlenkegel der Leuchte kann dadurch in jede beliebige Richtung gelenkt werden. Der kegelförmige, rückwärts mit reinem Silber hinterlegte Glasspiegel, der in seiner Form dem ihn als Mantel umgebenden Bakelitschirm entspricht, ist blau gefärbt. Auf diese Weise erhält das Licht eine tagesähnliche Farbe. Als Lichtquelle dient eine 15 Watt Glühbirne, deren vordere Kalotte soweit verspiegelt ist, daß von der Lichtquelle keine direkten Strahlen in den Strahlenkegel der Leuchte gelangen. Es ergibt sich dadurch ein ganz gleichmäßiges Licht, das nur aus den vom Spiegel reflektierten, dem natürlichen Tageslicht stark angenäherten Strahlen besteht. Die Vorschaltung von Filtern (Blauscheiben), die einen beträchtlichen Anteil (bis zu $^2/_3$) des Lichtstromes vernichten, vor die Lampe oder in den Beleuchtungsapparat des Mikroskopes, entfällt aus diesem Grunde. Durch das hohe Richtungsvermögen des Tageslichtspiegels erhält man trotz der kleinen Glühbirne Beleuchtungsstärken von 1000—1500 Lux auf dem Spiegel des Mikroskopes. Die Beleuchtung ist am besten, wenn die Lampe etwa 15 cm Abstand vom Spiegel des Mikroskopes hat und wenn der Spiegel so eingestellt wird, daß sich ein intensiv blaues Licht ergibt.

Als Lichtquelle für Dunkelfeldbeleuchtung ist die Lampe nicht geeignet.

Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Zeetti, R., Nouvelle méthode pour colorer facilement les spores des schizomycètes. (Soc. Intern. di Microbiol. Boll. della Sez. Ital. Vol. 7. 1935. p. 310—311.)

Diese neue Methode der Differentialfärbung von Bakterien-Sporen bietet gegenüber den bereits bekannten einige wesentliche Vorteile. Sie ist stets schnell und einfach ausführbar und liefert immer einwandfreie Ergebnisse. Vor allem gibt es hier keinen Zeitfaktor wie bei anderen Methoden bei der Differenzierung mit Alkohol, Säuren oder Salzen, wovon das Gelingen solcher Färbungen in erster Linie abhängt. Gebraucht werden 2 Lösungen: A) Lugolsche Lösung 100, Eosin w. gelbl. 5, Phenol krist. 5. Nachdem alles gelöst ist, empfiehlt es sich, zu filtrieren. Die Lösung ist dann sehr lange haltbar. B) 1 Teil gesättigte alkoholische Lösung von Methylenblau in 15—20 Teilen Wasser. Der in üblicher Weise hergestellte Ausstrich wird mit Lösung A übergossen und 5 Min. lang 2—3 mal bis zum Sieden erhitzt. Dabei bildet sich kein Niederschlag. Nach kurzem Abspülen mit destill. Wasser wird 1,5—2 Min. mit Lösung B nachgefärbt.

Nach abermaligem kurzen Abspülen mit destill. Wasser und Abtrocknen des Präparates kann es in Kanadabalsam eingebettet werden. Die Bakterien sind blau und die Sporen tief rot gefärbt. Bortels (Berlin-Dahlem).

Thornton, H. R., and Sandin, R. B., Standardization of the methylene blue reduction test by the use of methylene blue thiocyanate. (Am. Journ. Publ. Health. Vol. 25. 1935. p. 1114—1117.)

Da es neuerdings gelungen ist, Methylenblau-Thiozyanat mit fast 100proz. Reinheit herzustellen, glaubten Verff., mit Hilfe dieses Methylenblau-Farbstoffs der Standardisierung der Reduktionsprobe wieder nähertreten zu können. Sie arbeiteten ein einfaches Verfahren aus, dieses Methylenblau-Thiozyanat selbst herzustellen und führten damit Untersuchungen im Vergleich mit den amerikanischen Standardtabletten und den in Europa gebräuchlichen von Blauenfeldt und Tvede (Kopenhagen) aus. Wenn bei Gebrauch der dänischen Tabletten eine Farbstoffverdünnung in der Milch von 1 : 200 000 zustande kommt (krist. Methylenblauchlorid), dann beträgt die Konzentration bei Benutzung der amerikanischen Tabletten (die nur 40—46% ihrer angeblichen Stärke besitzen) 1 : 465 000 im Durchschnitt. Verwendet man Methylenblau-Thiozyanat, dann genugt bereits eine Konzentration von 1 : 700 000, um in Milch dieselbe Farbtönung wie im amerikanischen Standardverfahren zu erreichen. Die beobachteten Variationen in der Farbstoffkonzentration betragen beim Methylenblau-Thiozyanat nur 3,25%, bei den Standardtabletten jedoch 15%. Auf Grund weiterer Untersuchungen wurde dann eine Konzentration des Methylenblau-Thiozyanats von 1 : 300 000 in gleicher Weise gunstig für Milch und Rahm befunden. Durch die stärkere Dosis wird die Reduktionszeit für die meisten Milchen etwas verlängert und zwar um rund 30 Min. im Vergleich zum amerikanischen Standardverfahren. Man erreicht dann fast die Reduktionswerte, die bei Anwendung der dänischen Methylenblautabletten erzielt werden. K. J. Demeter (München-Weihenstephan).

Smith, K. M., and Doncaster, I. P., The preparation of gradocol membranes and their application in the study of plant viruses. (Parasitology. Vol. 27. 1935. p. 523.)

Die Arbeit enthält eine genaue Anweisung für die Herstellung von „Gradokol"-Membranen (Filtermembranen) nach Elford und ihre Anwendung zur Bestimmung der Teilchengröße von Pflanzenviren. Die neuen Membranen haben den Vorzug, daß die Porengröße bei der einzelnen Membran viel geringere Schwankungen aufweist als bei der Essigsäure-Kollodium-Membran und daß sich die Porengröße mit einem hohen Grad von Genauigkeit bestimmen läßt. Die Grundlage der Gradokolmembran ist Äther-Alkohol-Kollodium. Die Bestimmung der Teilchengröße des tobacco necrosis-Virus mit der neuen Methode ergab Werte zwischen 20 und 30 $\mu\mu$ (Smith, K. M. und Bald, I. G., Parasitology. Vol. 27. 1935. p. 231 ff.).

E. Köhler (Berlin-Dahlem).

Schnegg, H. und Weigand, K., Das Mikropolychromar im Dienste der biologischen Betriebskontrolle. (Ztschr. f. d. ges. Brauwesen. Bd. 58. 1935. S. 53—58.)

Verff. besprechen die Wirkungsweise und den Aufbau des Mikropolychromars von Zeiß und legen die Anforderungen der biologischen Brauereibetriebskontrolle an das neue Gerät dar. Die verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten der Farbfilter wurden an Hand von Versuchen auf ihre Brauchbarkeit und ihren Anwendungsbereich geprüft. Die bei der biologischen Betriebskontrolle in Frage kommenden Organismen: Hefen verschiedenen Alters und Ernährungszustandes; Hefen in Sporulation vom Gipsblock; Milchsäure-, Thermo- und Essigbakterien, Pediokokken; Hefen- bzw. Schimmelpilzsporen und -Konidien im hängenden Tropfen; Spirillum volu-

tans wurden einer systematischen Untersuchung unterzogen. Dabei wurde festgestellt, daß die Mischfeldbeleuchtung verbunden mit optischer Färbung eine wesentliche Erleichterung für die mikroskopische Untersuchung der Bakterien hinsichtlich ihres morphologischen Charakters bietet. Es gelingt ferner bei geeigneter optischer Färbung die Unterscheidung der Bakterien von Eiweißpartikelchen in Würze und Bier. Das Mikropolychromar ist sehr gut geeignet zur Kontrolle von Hefen auf ihren Plasmazustand. Die Anwendung der Farbfilter erlaubt, Hefesporen in auffälliger Kontrastwirkung darzustellen und schließt dadurch Irrtumsmöglichkeiten aus. Die Kontrastfärbung bietet beim Absuchen von Tröpfchenkulturen bei der Einzellkultur große Erleichterung. Verff. bringen eine Aufstellung über die wichtigsten Anwendungsbereiche des Mikropolychromars bei der biologischen Betriebskontrolle und besprechen die Möglichkeiten seiner Anwendung für allgemein mikrobiologische Zwecke. Heuß (Berlin).

Linderstrøm-Lang, K., Weil, L., and Holter, H., Studies on enzymatic histochemistry. XV. A micro-estimation of arginase. (Compt. rend. Carlsb. Sér. chim. Vol. 21. 1935. p. 7—14.)

Es werden zwei Methoden beschrieben: Die bekannte Ureasemethode, für die eine abgeänderte Technik angeführt wird, und eine zweite, die mit starker Alkohol-Azeton-Zugabe arbeitet unter Beigabe von Thymolblau als Indikator. Die zweite Methode ist trotz der beiden Nachteile jedoch der Ureasemethode vorzuziehen. Die Nachteile sind: Größere Mengen Urease stören, da durch die nachfolgende Spaltung des Harnstoffs der Titer höher als theoretisch möglich wird. 2. Von dem in Freiheit gesetzten Ornithin werden nur 95% der Theorie titriert. Dieser Fehler soll jedoch nicht so ins Gewicht fallen. Skallau (Berlin).

Leunig, H., Über die baktericide Wirkung von Ammoniumpersulfat. (Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. 117. 1935. S. 257—262.)

Ammoniumpersulfat wirkt bereits als sehr verdünnte Lösung stark bakterizid (geprüft gegenüber Staphylokokken, Coli, Pyocyaneus und Diphtheriebakterien). Seine Wirksamkeit wird durch sehr geringe Zusätze von organischen Säuren, die selbst eine schwache keimtötende Wirkung besitzen, beträchtlich erhöht. Da es nicht toxisch wirkt, geruchlos und in den in Frage kommenden Konzentrationen fast geschmacklos ist, stellt es ein wertvolles Desinfektionsmittel dar, besonders in Verbindung mit minimalen Zusätzen von Salizyl- und Benzoesäure. Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Morphologie, Physiologie und Systematik der Mikroorganismen; Virusuntersuchungen.

Ehrismann, O. in Gemeinschaft mit **Hartmann, P., Seefried, J.** und **Wiechert, F.,** Über die differentialdiagnostische Abgrenzbarkeit der Enterokokken. (Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. 117. 1935. S. 307—340.)

Auf Grund der genauen Analyse von 150 Streptokokkenstämmen, die vorwiegend aus der Mundhöhle und den Faeces gezüchtet wurden, kommen Verff. zu folgendem Schluß: „Enterokokken“ lassen sich weder im Sinn einer eng umschriebenen Bakterienart noch eines eindeutig definierbaren Typus aus der Gesamtheit der im Magen-Darmkanal vorkommenden Strepto-

kokken differentialdiagnostisch abgrenzen. Auch einzelne bei den Streptokokken des Magen-Darmkanals zu beobachtende Merkmale, wie z. B. das Aeskulinspaltungsvermögen oder das Verhalten in Lackmusmilch, sind hierzu nicht geeignet. Insbesondere gestatten die üblichen morphologischen, kulturellen und biochemischen Methoden keinen Rückschluß auf das Verhalten der einzelnen Stämme im menschlichen und tierischen Körper bzw. ihre pathogenetische Bedeutung. Ebensowenig sind sie — was im besonderen für das Aeskulinspaltungsvermögen gilt — ein sicherer Beweis für die Herkunft der betreffenden Stämme aus dem Darm. Die Streptokokken des Magen-Darmkanals setzen sich aus zahlreichen kleinen Varianten (Typen) zusammen, deren Konstanz im Körper und besonders auf den üblichen Nährmedien durchaus beträchtlich sein kann. Es ist nicht möglich, sie zu einer Einheit zusammenzufassen. Der „Enterokokkus" stellt demnach einen Sammeltypus dar. Auch die Abgrenzung einer Streptokokkenform als Strept. haemolyticus lentus erscheint nicht berechtigt, da das Auftreten von Späthämolyse — abgesehen von seiner Konstanz — bei anderen im übrigen sehr verschiedenartigen Streptokokkenformen beobachtet wird. Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Dold, H. und **Du, D. H.**, Über das Vorkommen Säure-Alkohol-fester Formelemente in Diphtheriebazillenkulturen. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 134. 1935. S. 445—446.)

In Diphtheriebakterien-Kulturen, namentlich in älteren Kulturen, in denen Harnstoff-Alkohol-feste Granula in großer Zahl auftraten, fanden sich auch Säure-Alkohol-feste Formelemente. Das Auftreten dieser Formelemente legt die Annahme einer näheren Beziehung der Corynebakterien, insbesondere der Diphtheriebakterien, zu der Gruppe der „Säurefesten" nahe.

Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Dold, H. und **Du, D. H.**, Die Bedingungen für das Auftreten der Harnstoff-Alkohol-festen Granula (sog. Dold-Granula) in Diphtherie- und Pseudodiphtheriebazillenkulturen. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 134. 1935. S. 439—444.)

Die von Dold bei Corynebakterien beobachteten Harnstoff-Alkohol-festen Granula traten bei Diphtherie- und Pseudodiphtheriebakterien in festen Kulturen vom 7.—8. Tage ab fast regelmäßig und mit zunehmendem Alter der Kulturen in steigender Zahl auf. In den Kulturen mit vielen Granula wurden auch noch andere Harnstoff-Alkohol-feste Formelemente festgestellt. In den Pseudodiphtheriebakterien-Kulturen waren Dold-Granula erheblich weniger zahlreich als in den Diphtheriebakterien-Kulturen. Ihr Auftreten war an die Lebens- und Stoffwechselvorgänge der Diphtherie- und Pseudodiphtheriebakterien gebunden. Besonders frühzeitig und zahlreich wurden sie in den bei 37° gehaltenen Kulturen beobachtet. In gleicher Weise wirkte schwach saure (bis p_H 6,5) und schwach alkalische (bis p_H 7,5) Reaktion des Nährmediums. Bei 46° (Absterben der Kulturen) verschwanden die Granula allmählich. Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Hettche, H. O., Die Abwandlung der Diphtheriebazillen. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 134. 1935. S. 421—431.)

Es wurden Abwandlungen zu Kokken, in seltenen Fällen zu Streptokokken beobachtet. Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Tanaka, K., Zur Physiologie der Essigbakterien. II. (Act. Phytochim. Vol. 8. 1935. p. 285—313.)

Bact. aceti oxydiert folgende Säuren: Milchsäure, Bernsteinsäure, Essigsäure, Brenztraubensäure, Äpfelsäure, Fumarsäure, Maleinsäure, Malonsäure, dagegen nicht Ameisensäure, Propionsäure, Oxalsäure, Glutarsäure, Glykolsäure, Weinsäure, Zitronensäure. Die hier angeführte Reihenfolge der oxydierbaren Säuren entspricht der Geschwindigkeit der O_2-Aufnahme. Die respiratorischen Quotienten (CO_2/O_2) stimmen gut mit den berechneten überein. Die O_2-Aufnahme war bei Zugabe von Bernsteinsäure im Warburg-Manometer mengenmäßig am stärksten. Die Vorkultur spielt nur bei Gegenwart von Essigsäure als Nährsubstrat eine größere Rolle, in Glukose-Alkohol ist hier die Oxydation am besten, es folgt Alkohol, schließlich Glukose. Abhängig ist die O_2-Aufnahme von der Substratkonzentration, optimal ist m/10—m/30, dazu gehört ein optimaler p_H-Wert von 5, nur Essigsäure verlangt etwa 7. Das Fehlen des Summationseffektes in kombinierten Substraten deutet auf die Gültigkeit des Thunberg-Wielandschen Abbauschemas hin, nur Milchsäure macht eine Ausnahme. Trotzdem sind Aldehydrase und Alkoholhydrase zwei verschiedene Enzyme, von denen das erste bei Erwärmen auf 70° C während 30 Min. 84,3% seiner Wirksamkeit verlor, das zweite bei 60° in derselben Zeit fast gänzlich zerstört wird. Die O_2-Aufnahme wird durch m/1000 Chinon vollständig unterbunden, auch Methylenblau kann von den Bakterien nicht als H-Akzeptor verwandt werden. Reiner O_2 wirkt hemmend auf die Atmung. Abgesehen von der Essigsäure liegt das günstigste Verhältnis von O_2 zu H_2 bei 1 : 4, für Essigsäure bei 1 : 9. Durch Toluol tritt ebenfalls eine Schädigung der Dehydrasen ein, die wie bei Chinon teilweise irreversibel ist. Monojodessigsäure hemmt bei m/5000, KCN schon bei m/50 000, im letzten Falle bei Brenztraubensäure weniger stark (Verbindung zwischen KCN und Br.?). Die Kohlenoxydhemmung ist etwa ebenso stark wie bei der Glukonsäurebildung, jedoch schwächer als bei der Essiggärung, sie kann durch Belichtung teilweise wieder rückgängig gemacht werden. Skallau (Berlin).

Korsakowa, M., Die Reduktion der Nitrate als Oxydations-Reduktionsprozeß. (Die Fortschritte der biologischen Chemie. Folge 10. 1934. S. 33—48.) [Russ.]

Die Reduktion der Nitrate durch fakultativ-anaerobe Bakterien ist die Folge eines Oxydations-Reduktionsprozesses, der auf Kosten der Endprodukte der Gärung bzw. auf Kosten der in die Lösung gebrachten organischen Stoffe geschieht. Die Reduktion der Nitrate verläuft immer nach demselben Schema und unabhängig davon, welches die Endprodukte der Reduktion sind, also ob die Reduktion zu Nitriten bzw. zu freiem N führt. Im ersteren Fall spielen sich nacheinander zwei Oxydationsprozesse, im zweiten drei Oxydationsprozesse ab.

M. Gor'dienko (Berlin-Schöneberg).

Korsakowa, M. und **Bylinkina, W.**, Die Denitrifikation als Resultat der kombinierten Bakterientätigkeit. (Arbeiten des Allrussischen Instituts f. landwirtschaftl. Mikrobiologie. Bd. 5. 1933. S. 58—66.) [Russ.]

Verff. studierten biochemische Eigenschaften des Bac. turanicum und Bac. nitrosovorum. Bac. turanicum reduziert Nitrate zu Nitriten, die dann (nach dem Schema $2\,KNO_3 \rightarrow 2\,KNO_2$; $2\,KNO_2$

$\rightarrow 2\, KNO$) wahrscheinlich in Nitroxyl bzw. in untersalpetrige Säure verwandelt werden. Bac. nitrosovorum reduziert Nitrite (sowie Nitroxyl) zu N_2, wobei der Reduktionsprozeß im ersteren Falle in folgender Weise verläuft: $C_6H_{12}O_6 + 2\, KNO_2 \rightarrow CO_2 + 2\, KNO$; $C_6H_{12}O_6 + 2\, KNO \rightarrow CO_2 + N_2$. Bei gleichzeitiger Tätigkeit beider Bakterienarten wird die erste Reduktionsphase der Nitrate durch Bac. turanicum, die zweite Phase bis zu (HNO) wahrscheinlich durch die beiden Bakterienarten bedingt; die Reduktion von HNO zu N_2 wird ausschließlich durch Bac. nitrosovorum bedingt. M. Gordienko (Berlin-Schöneberg).

McClung, L. S., and McCoy, E., Studies on anaerobic bacteria. VII. The serological relations of Clostridium acetobutylicum, Cl. felsineum and Cl. roseum. (Arch. f. Mikrobiol. Vol. 6. 1935. p. 239—249.)

Es wurde mit der Agglutinationstechnik verbunden mit Adsorptionsversuchen das serologische Verhalten von Clostridium acetobutylicum, felsineum und roseum untersucht und zwar als W-Faktor (ganze, unbehandelte Zellen), O-Faktor (Zellen 2 Stunden im strömenden Dampf erhitzt) und H-Faktor (Geißel-Suspension, durch langes Zentrifugieren vom Zellmaterial getrennt). Jeder Organismus besitzt ein artspezifisches Agglutinogen im H-Faktor, während der O-Faktor allen dreien gemeinsam ist. Doch besitzt acetobutylicum etwas des felsineum-H-Faktors. Im übrigen wurde keine weitere Beimischung des H-Faktors bei den drei Formen gefunden. Rippel (Göttingen).

Issakowa, A., Zum Chemismus der Stickstoffassimilation. (Nachrichten der Akademie der Wissenschaften U.d.S.S.R. Bd. 10. 1933. S. 1493—1504.) [Russ.]

Verf. studierte die Stickstoffbindung (aus der Luft) durch Az. chroococcum und Az. vinelandii. Die Versuche zeigten, daß beim Wachstum der beiden Arten in Sand- bzw. in flüssigen Kulturen mit Mannit, Glukose, essigsaurem Natrium usw. sich NH_3 bildet. Die NH_3-Bildung geschieht sehr schnell (schon nach 12—24 Std.) auf dem $C_2H_3O_2 \cdot Na$, viel langsamer auf dem Mannit. Die Fixation verläuft bei Az. vinelandii schneller als bei Az. chroococcum.

M. Gordienko (Berlin-Schöneberg).

Bassalik, K. und Neugebauer, J., Über die „Stimulation" von Azotobacter durch Eisen. (A. Soc. Bot. Pol. Vol. 10. 1933. p. 481—493.)

Die Frage eines Einflusses von Fe auf die N-Bindung durch Azotobacter ist 1931 schon von den Verff. berührt worden. Durch die widersprechenden Angaben von Burk und Mitarbeiter veranlaßt, nehmen Verff. eingehend Stellung zur Fe-Frage an Hand ihrer experimentellen Daten. Sie erkennen an, daß Fe für Azotobacter lebensnotwendig ist, die angeführten Tabellen zeigen deutlich den begünstigenden Einfluß. Unter den 20 verschiedenen angewandten anorganischen und organischen Fe-Salzen wirkt Fe-saccharat am stärksten, aber immer noch nicht so intensiv wie Bodenextraktasche. Am günstigsten erwies sich die Beigabe von Bodenextrakt. Während des Wachstums der Kulturen im flüssigen Medium wurden interessante Beobachtungen gemacht: So wirken z. B. Erschütterungen auf junge Kulturen sehr nachteilig, eine Parallelität zwischen Trübungsgrad

und N-Bindung besteht nicht. Es besteht ferner keine Proportionalität zwischen Fe-Gabe und N-Bindung. Das ist auch sehr schön ersichtlich aus den Versuchen mit Wieseneisenerz. Es ergibt sich, daß Azotobacter offenbar imstande ist, aus jeder Fe-Verbindung das Fe zu assimilieren. Die Möglichkeit besteht, daß die Menge des aufgenommenen Fe in Abhängigkeit von der Fe-Verbindung unterschiedlich sein kann und sie dementsprechend als wachstumsbegrenzender Faktor auftritt. Fe ist ebenso wie Mo nach Ansicht der Verff. nicht allein für die Boden- bzw. Humuswirkung verantwortlich zu machen. Sie meinen, daß Azotobacter und alle Organismen, deren optimaler p_H-Bereich bei 7 liegt, sich nur schwer mit Fe und auch mit Phosphorsäure versorgen könnten. Skallau (Berlin).

Flancówna, P., Wplyw „cial wzrostowych" z koleoptil i korzonkow Zea Mays L. na rozwoj i wiazanie elementarnego azotu przez rozne szczepy Azotobacter chroococcum Beij. [Einfluß von Koleoptilen und Radiculae-Wuchsstoffen von Zea Mays L. auf die Stickstoffbindung verschiedener Stämme von Azotobacter chroococcum Beij.] (A. Soc. Bot. Pol. Vol. 10. 1933. p. 521—535.)

Wäßrige Extrakte von Koleoptilen und Wurzeln des Maises sollen auf die N-Bindung von Azotobacter anregend wirken. Dabei ist der Wirkungsgrad gekochter wäßriger Auszüge der gleiche wie der ihrer Trockensubstanz. Die entsprechenden Destillate wirken schwächer, die betr. Rückstände stärker. Wurden beide zusammen gegeben, so trat eine höhere Wirkung auf, als aus der Summation der Einzelfaktoren berechnet werden konnte. Anwendung des veraschten Rückstandes der Extrakte begünstigte ebenfalls die N-Bindung der 10, aus verschiedenen Gegenden Polens stammenden Stämme. Bei Steigerung der Konzentration der Aschenbeigabe trat jedoch eine rückläufige Bewegung auf. Die physiologische Ungleichheit der zur Untersuchung gelangten Stämme wird für das verschiedene Verhalten verantwortlich gemacht. Skallau (Berlin).

Hoder, F., Versuche mit den neuen Desinfektionsmitteln Trioform-Standard und Trioform-Goldsiegel. (Med. Klinik. Jahrg. 31. 1935. S. 885—886.)

Die Präparate Trioform-Standard und Trioform-Goldsiegel entfalten eine beträchtlich stärkere Wirksamkeit als Sagrotan und Kalbolsäure. Trioform-Standard übertraf im Rideal-Walkerschen-Versuch Sagrotan um das 13—15fache (gegenüber Koli-, Typhusbakterien und Staphylokokken), Karbolsäure um das 30—40fache; Trioform-Goldsiegel übertraf Sagrotan um das 4—16fache (gegenüber Diphtherie-, Koli-, Typhusbakterien, Streptokokken, Staphylokokken), Karbolsäure um das 20—50fache. Zur Händedesinfektion wird Trioform-Goldsiegel in 2proz. Lösung empfohlen, das während 5 Min. langer Einwirkung auch größte Bakterienmengen sicher abtötet. Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Schneider, G., Untersuchungen über das Desinfektionsmittel Zephirol. (Ztschr. f. Immunitätsforsch. u. exper. Therapie. Bd. 85. 1935. S. 194—199.)

Das Desinfektionsmittel Zephirol zeigte besonders intensive Wirkung gegenüber grampositiven Bakterien, während manche gramnegative Bak-

terien (vor allem Bact. proteus und pyocyaneum) widerstandsfähiger waren. Die Wirksamkeit des Präparates wurde durch Gegenwart von Eiweiß nicht wesentlich herabgesetzt. Eine gewisse Verringerung der Wirksamkeit trat ein bei Zusatz von Seife zur Lösung des Desinfektionsmittels. Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Winge, Ö., and Hjort, A., On some Saccharomycetes and other Fungi still alive in the pure cultures of Emil Chr. Hansen and Alb. Klöcker. (Compt. rend. Carlsb. Sér. physiol. Vol. 21. Nr. 2. 1935. p. 51—58.)

Es wurden sehr alte Kulturen von Saccharomyzeten u. a. auf ihre Lebensfähigkeit hin untersucht. Die Pilze stammten aus den Jahren 1886—1922. Hansen selbst hatte schon 16—17 Jahre alte Kulturen studiert und gefunden, daß 10 proz. Zuckerlösung der beste Nährboden ist, wenn sie lange lebensfähig bleiben sollen. Verff. fanden von den Hansenschen Pilzkulturen noch 14% lebend, von den auf Bierwürze angelegten alle vorhandenen 10. Von den Klöckerschen Proben, die in den Jahren 1913—1922 aus den alten, von Hansen angelegten, übergeimpft waren, zeigten sich 25% lebensfähig. Verschiedene Formen von Sacch. Past. Hans. erwiesen sich als sehr widerstandsfähig. Nähere Einzelheiten sind den Tabellen im Original zu entnehmen. Es darf jedoch nicht vergessen werden, daß es sich hier nicht um eine systematische Untersuchung handelt, die sich über viele Jahre erstreckte. Infolgedessen sind die Ergebnisse vielfach von großen Zufällen bedingt. Man kann ihnen daher keine Bedeutung zumessen. Skallau (Berlin-Dahlem).

Rippel, A. und Kreutzmann, P. H., Rassenumwandlung bei Aspergillus niger. (Arch. f. Mikrobiol. Bd. 6. 1935. S. 276—289.)

Die schon oft beobachtete Veränderung einzelner Rassen von Aspergillus niger wurde an zwei Formen untersucht, der wenig Oxalsäure bildenden Rasse Göttingen alt, die nach Zuckerverbrauch neutrale bzw. schwach alkalische Reaktion zeigt und durch Autolyse die Nitrat-Nährlösung braun färbt, und der viel Oxalsäure bildenden Rasse Göttingen neu, welche die Nitratnährlösung nach Zuckerverbrauch nur ganz schwach gelblich verfärbt, wobei die Nährlösung stark sauer bleibt. Beide unterscheiden sich auch in Menge der gebildeten Konidien, Größe der Köpfchen usw.

Zahlreiche Einsporkulturen behielten, normal weitergezüchtet, das Bild ihrer Ausgangsrasse. Verschiedene Behandlungen jedoch (Trocknen der Sporen, Passage über Tannin- und Oxalsäurelösung) bewirkten, daß die beiden Rassen sich veränderten, und zwar jeweils im Sinne der Gegenrasse. Die Veränderung umfaßte sowohl das physiologische wie auch das morphologische Bild und ist, soweit verfolgt, 3—8 Generationen hindurch konstant geblieben. Der Übergang der Rasse Göttingen neu in die Rasse Göttingen alt ging bedeutend leichter vor sich als umgekehrt. Durch Oxalsäurepassage wurde die Rasse Göttingen neu stärker in der Richtung der braunen Autolyse beeinflußt, die Rasse Göttingen alt stärker in der anderen Richtung.
Rippel (Göttingen).

Wassiljew, G. M., Über die Einwirkung von Zink auf den Stoffwechsel von Aspergillus niger. (Arch. f. Mikrobiol. Bd. 6. 1935. S. 250—275.)

Die Versuche wurden mit verschiedenen Stämmen von Aspergillus niger ausgeführt, die sich in der Stärke der Glukonsäurebildung unter-

schieden, im übrigen zu den Zitronensäurebildnern gehören. Der Einfluß des Zink, das Verf. ebenfalls für ein notwendiges Element hält, zeigt sich besonders in seiner Wirkung auf die wachsende Zelle. Zinkzusatz (mit frischer Nährlösung) nach Beendigung des Wachstums hatte nur mehr eine geringe Wirkung. Dagegen zeigt sich sein Einfluß, wenn das erste Wachstum unter dem Einfluß von Zink steht: Die Größe des Atmungswertes (g CO_2/g Pilzgewicht) wird allerdings nicht beeinflußt, jedoch ist der ökonomische Koeffizient sehr verschieden, was damit zusammenhängt, daß Bildung und Verbrauch von Zwischenprodukten sowie von Glucon- und Zitronensäure stark beeinflußt werden. Teilweise werden bei Zinkzusatz die genannten Säuren viel stärker abgebaut, teilweise aber findet sich, bei den typisch Zitronensäure bildenden Stämmen, eine starke Zunahme von Zitronensäure unter der Wirkung von Zinkzusatz. Die Verhältnisse erscheinen noch sehr wenig durchsichtig. Rippel (Göttingen).

Rippel, A. und Behr, G., Über die Verwertbarkeit der von Aspergillus niger ausgeschiedenen Stickstoffverbindungen. (Archiv f. Mikrobiologie. Bd. 6. 1935. S. 359—361.)

Von wachsendem Aspergillus niger-Myzel werden in das Substrat organische Stickstoffverbindungen ausgeschieden, die im Vergleich zu Peptonstickstoff vom Pilz nur schlecht (nur zu ungefähr $^1/_3$) verwertet werden können. Es wird die Vermutung ausgesprochen, daß diese Verbindungen in irgendeinem Zusammenhang mit den bei der neutralen Autolyse gebildeten Farb- und Huminstoffen stehen. Rippel (Göttingen).

Ronsdorf, L., Vergleichende Untersuchungen über die Wirkung verschiedener Wuchsstoffe auf das Wachstum einiger Pilze. (Archiv f. Mikrobiologie. Bd. 6. 1935. S. 309—325.)

Versuche mit reinem Auxin a ergaben bei Aspergillus niger, Ophiobolus graminis, Pythium mamillatum keine Wirkung, gemessen am Trockensubstanzertrag. Indessen war das Auxin, auch wenn es nach der Sterilisation zugegeben wurde, zerstört. Die Testprüfung wurde mit der Avena-Methode vorgenommen.

Bios wirkte fördernd auf die Trockensubstanzerzeugung von Aspergillus niger, Sporodinia grandis, Allomyces javanicus, Ascochyta pisi, Glomerella cingulata, Ophiobolus graminis, Cercosporella herpotrichoides, Phytophtora citrophtora, erythroseptica, terrestris, cactorum. Es war ohne Einfluß auf Helminthosporium sativum, Pythium irregulare und de Baryanum und wirkte hemmend auf Pythium mamillatum und intermedium. Auffallend ist vor allem das verschiedene Verhalten der verwandten Pythium-Phytophtora-Formen. Der in der Bioslösung vorhandene Hemmungsstoff konnte nicht von dem fördernden Stoff getrennt werden.

Auch die Bildung von Auxin a, ferner auch von Auxin b (im letzten Falle gemessen am Trockengewicht von Aspergillus niger) konnte nachgewiesen werden. Glomerella cingulata bildete besonders viel Auxin a, Rhizopus suinus besonders viel Auxin b.

Rippel (Göttingen).

Yamamoto, A. und **Yamagata, S.**, Thermochemische Untersuchungen über die Energiebilanz bei dem Wachstumsvorgang des Schimmelpilzes. (Act. Phytochim. Vol. 8. 1935. p. 245—254.)

Diese Arbeit schließt an frühere Studien von Tamiya und Yamagata über die energetischen Verhältnisse beim Wachstumsvorgang von Aspergillus oryzae an. Algera hatte ebenfalls kalorimetrische Messungen an solchen Pilzkulturen vorgenommen, aber nach Ansicht der Verff. aus dem richtig durchgeführten Experiment nicht die richtigen Schlußfolgerungen gezogen. Um unbedingt sicher zu gehen und die Ansichten Tamiyas weiter zu befestigen, wurden nochmalige Untersuchungen über die wahre Energiebilanz angestellt. Die Bildung des Schimmelpilzkörpers verläuft exotherm, neben der Atmungsenergie werden noch 632,5 cal/g Pilzkörper abgegeben. Dies steht in Parallele mit dem Stoffumsatz, wonach 63,3 ccm CO_2 zusätzlich neben der Atmungs-CO_2 beim Aufbau von 1 g Pilzkörpersubstanz frei werden. Verff. bezeichnen die Übereinstimmung mit dem theoretischen Wert von Tamiya — 500 cal — als ausreichend.

Skallau (Berlin).

Schopfer, W. H. und **Jung, A.**, Facteurs de croissance et vitamines chez les plantes. Recherches sur l'action des extraits d'Aspergillus sur le développement de Phycomyces. (Archiv f. Mikrobiologie. Bd. 6. 1935. S. 334—344.)

Extrakte von Aspergillus niger, oryzae, violaceofuscus, flavus können die Nährlösung von Phycomyces blakesleeanus aktivieren. Der Tierversuch zeigte, daß Aspergillus zweifellos das Vitamin B 1 synthetisiert, dem also, da die Wirkung des reinen Vitamins B 1 auf Phycomyces bekannt ist und auch die Löslichkeitsverhältnisse des fraglichen Faktors denen des Vitamins B 1 entsprechen, die Wirkung auf Phycomyces zuzusprechen ist. Möglicherweise bildet Aspergillus noch weitere Faktoren. Die Sporen enthalten nur wenig des Vitamins. Rippel (Göttingen).

Schopfer, W. H. und **Jung, A.**, Recherches sur la synthèse de la vitamine B 1 par Phycomyces. (Archiv f. Mikrobiologie. Bd. 6. 1935. S. 345—349.)

Verff. prüften am Tierversuch, ob Phycomyces blakesleeanus das Vitamin B 1 aus der Nährlösung aufnimmt oder synthetisiert. Das ist nicht der Fall. Die Wirkung des Vitamins auf den Pilz ist also nur so zu erklären, daß der Pilz auf Grund des Vitamins einen anderen Faktor bildet, der nun wieder die Kultur eines neuen Pilzes aktivieren kann (Faktor M; daneben ist noch Bios vorhanden). Rippel (Göttingen).

Brown, Cl. A., Morphology and biology of some species of Odontia. (Bot. Gaz. Vol. 96. 1934/35. p. 640—675.)

Von den 12 untersuchten Odontia-Arten kamen in der Umgebung von Ann Arbor (Michigan) vor: O. arguta, fusco-atra, uda, stenodon, brinkmanni, hydnoides, fragilissima, separans, himantia, fimbriata, setigera; O. bicolor war in Louisiana gesammelt worden. Die ersten 8 und die letztgenannte wurden auch in Reinkultur gezogen. Zur genauen Unterscheidung der Arten voneinander kann das Verhalten der Zystidien, Gloeozystidien und des sub-

hymenialen Hyphengewebes gegen Jod-Chloralhydrat und eosinhaltiges K_2CO_3 herangezogen werden. Die Art Odontia fr. ist synonym mit Mycoacia (Acia, Oxydontia), Grandinia, Radulum und Kneiffia. Hydnum fragilissimum B. u. C., ferner H. separans Peck sind auf Grund des morphologischen Befundes und ihres physiologischen Verhaltens zu der Gattung Odontia gestellt worden. Von den 9 in Reinkultur gezüchteten Formen bildeten 5 Basidien und Basidiosporen und nur 2 Arten brachten Fruchtkörper hervor, die den in der Natur vorkommenden gleich waren. 7 Arten waren homothallisch, ihr Myzel bildete klammerartige Hyphenverbindungen. Die Beschreibung der einzelnen Arten ist dem Original zu entnehmen.

Skallau (Berlin).

Lamb, I. M., The Initiation of the Dikaryophase in Puccinia phragmitis (Schum.) Körn. (Ann. Bot. Vol. 49. p. 403—438. 1935.)

Dieser Rost ist auf Rumex crispus heterothallisch, die Spermogonien und Äzidien der heterözischen Form kommen auf Arten von Rumex (nicht R. acetosa) und Rheum vor, die Uredo- und Teleutolager auf Phragmites communis. Verf. schreibt den Spermogonien männliche Geschlechtsfunktionen zu. Hält man von einsporigen Pusteln Insekten fern, so bleiben sie steril, trotzdem Gewebe ausgebildet werden, die Äzidien ähneln. Überträgt man jedoch Spermatien auf diese Pusteln, so entwickeln sich in allen Fällen normale, offene Äzidienlager, wofür je nach dem Alter der Pusteln verschiedene Zeiten erforderlich sind. Im Gegensatz dazu bilden 50% und mehr der zweisporigen und alle mehrsporigen Pusteln offene Äzidien aus, trotzdem sie vor Insektenbesuch geschützt werden. Hier wird die Dikaryophase durch direkte Vereinigung innerhalb der Äzidialprimordien von Hyphen eingeleitet, die von verschiedenen Stämmen abkommen. Das Diplontenstadium kann also eintreten 1. durch Befruchtung mit Spermatien, 2. durch Vereinigung zueinander passender Hyphen in mehrsporigen Infektionen. Hierin ähnelt das Verhalten von P. phragm. dem von Ustilago Zeae und Doassansia Sagittariae. Bei strenger Isolation einsporiger Infektionen sterben die Spermogonien ab und werden durch andere ersetzt. Gelegentlich beobachtet man bei haplonten Äzidien vielkernige Zellen, die Verschmelzungen eingehen. Diese sind jedoch rein vegetativer Natur. Die künstliche Befruchtung einsporiger Infektionen mit Spermatien und die Entwicklung zum Zweikernstadium werden eingehend beschrieben. Wenn auch Vielkernigkeit vorkommen kann, die Ausgangssporen sind immer zweikernig. In einem gewissen Alter kann man Syngamie einsporiger Myzelien feststellen, Verschmelzungen jedoch zwischen Fruchtträgern untereinander oder zwischen diesen und Spermatien scheinen nicht stattzufinden. Versuche, die Äzidienwirte durch Spermatien zu infizieren, schlagen fehl. Am Schluß der Arbeit gibt Verf. eine reichhaltige Literaturübersicht.

Skallau (Berlin).

Thornberry, H. H., Effect of phosphate buffers on infectivity of tobacco-mosaic virus. (Phytopath. Vol. 25. 1935. p. 618.)

Verf. prüfte verschiedene Salze auf ihre Eigenschaft, die Infektiosität von Suspensionen des Tabakmosaikvirus herabzusetzen oder zu steigern. Als Testpflanze diente die Bohnensorte „Scotia“. Reibt man die Blätter dieser Pflanze mit dem Tabakmosaikvirus ein, so erscheinen auf ihnen nach einigen Tagen als Initialsymptome nekrotische Flecke. Die Zahl dieser

Flecke liefert ein Maß für die Infektiosität der Virussuspension. Es zeigte sich, daß die Valenz des Anions oder Kations der geprüften Salze keinen meßbaren Einfluß hatte. Zweibasische Phosphate steigerten hingegen bei 0,1 mol. Konzentration die Infektiosität sehr beträchtlich (auf das 4—5-fache). Die für die Infektiosität optimale Wasserstoffionenkonzentration wurde bei p_H 7,0—8,5 ermittelt. Das Virus wurde bei einstündiger Behandlung nicht aktiviert zwischen p_H 1,5 und 9,0. Bei p_H 10,6 trat innerhalb 4 Std. vollständige Aktivierung ein, bei p_H 11,2 schon innerhalb 5 Min.

Der Einfluß der Salze und Wasserstoffionenkonzentration erklärt sich entweder aus ihrer Wirkung auf die Empfänglichkeit der eingeriebenen Testpflanze oder aus ihrer Wirkung auf das Virus selbst oder aus beiden Faktoren. Einstweilen ist es nicht möglich, diese Faktoren sicher zu trennen.

E. Köhler (Berlin-Dahlem).

Mikrobiologie der Nahrungs-, Genuß- und Futtermittel.

Zeller, H., Über den Nachweis der Dauerpasteurisierung der Milch. (Arbeiten a. d. Reichsgesundheitsamte. Bd. 68. 1935. S. 41—55.)

Bei kritischer Würdigung der Literatur über die Nachweismethoden der Dauerpasteurisierung ergibt sich, daß bis heute noch kein Verfahren zur Verfügung steht, mit dem eine vorschriftsmäßig dauerpasteurisierte, d. h. ½ Std. lang auf 62—65° erhitzte Milch als solche mit Sicherheit zu erkennen ist. Wenn man an die vielen möglichen Schwankungen in der Zusammensetzung der Milch und außerdem an die verschiedenen Fehlerquellen denkt, die bei jeder Pasteurisierung gelegentlich einmal eintreten können, so erscheint es sehr fraglich, ob sich überhaupt ein Verfahren finden lassen wird, das sowohl die genaue Zeitdauer als auch die enge Temperaturspanne, innerhalb deren die Dauerpasteurisierung stattgefunden hat, anzuzeigen vermag. Man wird sich bei den Nachweismethoden mit einer möglichst engen Begrenzung der Temperatur- und Zeitspanne nach oben und unten begnügen müssen. Dieses Ziel ist aber nur durch die gleichzeitige Anwendung mehrerer Methoden erreichbar. Infolge dieser Schwierigkeiten sind alle nur möglichen Vorkehrungen für eine einwandfreie Durchführung der Dauerpasteurisierung bereits in den Molkereien zu treffen. Hierzu gehören insbesondere: Reinigung der Milch vor der Pasteurisierung; Zulassung nur solcher Pasteure, die zuvor von maßgebender Stelle auf ihre Zuverlässigkeit und Leistungsfähigkeit geprüft sind; Ausrüstung dieser Apparate mit amtlich geprüften Fernschreibethermometern; fortlaufende amtliche Überwachung aller Dauerpasteurisierungs-Anlagen, verbunden mit öfterer bakteriologischer Untersuchung der pasteurisierten Milch.

Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Kliewe, H. und Hsü, M., Über die Ursache des Absterbens von Typhusbazillen in saurer Milch. (Deutsche med. Wochenschr. Jahrg. 61. 1935. S. 1154—1155.)

Mit Hilfe eines von H. Schmidt, Marburg, angegebenen Dreihalskolbens, durch dessen Öffnungen ein Zellophanschlauch gezogen ist, wurde in Anlehnung an die Versuche von Gildemeister und Neustat untersucht, ob sich Typhus- und Colibakterien bzw. deren Stoffwechselprodukte in durch Zellophan getrennten Milchproben beeinflussen. Dies war nicht der Fall, trotzdem ein Austausch der abgebauten Nährstoffe und Stoffwechselprodukte und ein Ausgleich der Wasserstoffionenkonzentration

stattfand. Daraus geht hervor, daß der Säuregrad der Milch für das in der Regel rasche Absterben von Typhusbakterien in saurer Milch nicht verantwortlich zu machen ist. Dies ist vielmehr auf die antagonistische Wirkung von lebenden Colibakterien zurückzuführen. Worin dieses antagonistische Agens besteht, ist noch nicht endgültig geklärt. Offenbar spielen Lipoide und Fermente eine ausschlaggebende Rolle. Von Bedeutung sind weiter aber wahrscheinlich auch Zahl und Vermehrungsgeschwindigkeit der einzelnen Bakterienarten zur Zeit ihrer stärksten Entwicklung sowie Art und Menge der den Bakterien zur Verfügung stehenden Nährstoffe. Jedenfalls ist es epidemiologisch wichtig, daß Typhus-, Paratyphus- und Breslaubakterien auch in saurer Milch, Buttermilch usw. wochenlang lebensfähig bleiben können, namentlich bei niederer Temperatur. Befinden sich jedoch Bakterien aus der Coligruppe in der Milch, was ja gewöhnlich der Fall ist, so sterben die pathogenen Keime meist in wenigen Stunden bis Tagen ab.

Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Newitt, A. W., Glassen, J. W., and Pryer, R. W., An outbreak of milk-borne hemolytic streptococci infection. (Amer Journ. Publ. Health. Vol. 25. 1935. p. 804—812.)

Der Ausbruch einer Epidemie von eitriger Halsentzündung im Staate Michigan, die 186 Personen erfaßte und 6 Todesfälle zur Folge hatte, wurde durch Rohmilchgenuß verursacht. Die betreffenden Keime stammten von dem infizierten Viertel einer einizgen Kuh! Keiner der isolierten hämolytischen Streptokokken-Stämme zeigte das für den Epidemicus charakteristische feuchte, schleimige Kolonienwachstum, auch konnte keine Kapselbildung beobachtet werden. Diese Kuh ist wohl ursprünglich einmal von Menschen her durch pathogene Streptokokken infiziert worden, wobei darauf hingewiesen sei, daß hämolytische Streptokokken, soweit sie bei „septic sore throat“, Scharlach und Erysipel vorkommen, eher als variable Rassen denn als feststehende Arten zu betrachten sind.

K. J. Demeter (München-Weihenstephan).

Pederson, C. S., and Yale, M. W., Effect of temperature of incubation upon agar plate count of milk. (Amer. Journ. Publ. Health. Vol. 24. 1934. p. 477—484.)

Zur Prüfung, in welchem Maße das Ergebnis der Plattenkeimzählung durch verschiedene Bebrütungstemperaturen beeinflußt wird, wurden von den untersuchten Milchen verschiedener Art und Qualität jeweils 75 Parallel-Agarplatten nach dem Standardverfahren hergestellt. 5—10 Platten wurden jeweils bei folgenden Temperaturen 2 Tage bebrütet: 21, 25, 30, 32, 35, 37, 39, 45, 55°.

Die Ergebnisse waren folgende: Ganz allgemein ist die Bebrütungstemperatur von 32° während 48 Std. derjenigen von 37° vorzuziehen, und zwar 1. weil wesentlich höhere Kolonienzahlen erhalten werden, 2. weil sich die kaum vermeidlichen Temperaturschwankungen im Thermostaten (± 2°) bei der Temperatur von 32° weniger stark auf die Variabilität der Plattenzählungen auswirken, als solche bei 37° C, 3. weil der Prozentsatz der maximalen Keimzahlwerte nach 2 Tagen bei 37° C ganz beträchtlich variiert, während er bei 32° fast völlig konstant ist.

Aus diesem Grunde ist die Bebrütung bei 32° viel besser dazu geeignet, die Qualität verschiedener Milchproben miteinander in Vergleich zu ziehen.

K. J. Demeter (München-Weihenstephan).

Safford, C. E., and Stark, C. N., The advantages of skim-milk agar for the determination of the sanitary quality of market milk. (Journ. Dairy Sci. Vol. 18. 1935. p. 539—546.)

Verff. verwendeten einen Glukose-Magermilch-Fleisch-Extr.-Pepton-Agar; zum Vergleich mit diesem wurde auch der offizielle Standard-Agar herangezogen, der weder den Milch- noch den Kohlehydratzusatz besitzt. Zur Untersuchung kamen 760 Milchproben von 250 Händlern zur Winter-, Frühjahr- und Sommerzeit. Die Versuche zeigten, daß die Zugabe von vergärbaren Kohlehydraten und anderen Milchbestandteilen den Agar für die laboratoriumsmäßige Untersuchung von Milch und Molkereierzeugnissen sehr brauchbar macht.

Im besonderen ergab sich eine beträchtliche Überlegenheit des Magermilchagars bei Untersuchung pasteurisierter Milch, indem mit Hilfe desselben 2—4 mal höhere Werte erhalten wurden, als mit dem gewohnlichen Standardagar. Bei den Rohmilchproben waren die Kolonienzahlen des Magermilchagars nicht so unterschiedlich, aber auch immer noch höher wie beim Standardagar. Die Kolonien selbst waren durchweg größer und demzufolge leichter zu zählen. Die leichte Trübung des Mediums erleichterte die Besichtigung der Platten, wenn beim Zählen künstliches Licht verwendet wurde. Man konnte auch Säurebildner und Proteolyten darauf erkennen, des weiteren gediehen die Mastitisstreptokokken darauf sehr gut. Da die Herstellungsweise nicht schwieriger ist und die Kosten nicht höher sind als diejenigen des offiziellen Standardagars, ist der Magermilchagar vorzuziehen.

K. J. Demeter (München-Weihenstephan).

Plastridge, W. N., Anderson, E. O., and Weirether, F. J., A comparison of methods of detecting streptococci in freshly drawn milk samples. (Journ. of Dairy Sci. Vol. 18. 1935. p. 583—592.)

Von 360 Viertelgemelken zeigten rund 22% auf Grund der Laboratoriums-Untersuchungen Mastitis sowie die Anwesenheit von Streptokokken durch die eine oder andere der ausgeführten Proben. Von den im folgenden angeführten 6 Methoden verhielten sich die jeweils damit erhaltenen positiven Ergebnisse prozentual folgendermaßen (festgestellt an Hand der 79 positiven Fälle): 1. Direkte mikroskopische Untersuchung des Ausstrichs (Vollmilch) 3,8%; 2. Direkte mikroskopische Untersuchung des Ausstrichs (Sediment) 8,9%; 3. Blutagar-Platten mit einer 4-mm-Öse von Vollmilch ausgestrichen 60,8%; 4. Blutagar-Platten nach der Standard-Verdünnungsmethode beimpft (1 ccm einer $^1/_{10}$-Verdünnung) 76,0%; 5. Blutagar-Platten mit einer 4-mm-Öse von Sediment aus 10 ccm zentrifugierter Milch ausgestrichen 77,2%; 6. Mikroskopische Untersuchung von Ausstrichen aus über Nacht im Thermostaten aufbewahrten Milchproben 98,7%.

Aus dieser Zusammenstellung geht hervor, daß das Verfahren, die fragliche Milch über Nacht bei 37° zu bebrüten und dann erst die Ausstriche herzustellen, durchweg den höchsten Prozentsatz an positiven Proben ergeben hat. Bei weiterer Nachprüfung ergab sich jedoch unter Anwendung der übrigen Mastitis-Nachweisverfahren, daß von den 98,7% positiven Proben 13,5% ein falsches positives Ergebnis gezeitigt hatten. Infolgedessen ist es nicht richtig, nur auf Grund dieser Methode allein Mastitis feststellen zu wollen, sondern sie muß immer auch mit einer Isolierung und Identifizierung der gefundenen Streptokokken kombiniert werden.

K. J. Demeter (München-Weihenstephan).

Hussong, R. V., and Hammer, B. W., The preparation of mold powder for blueveined cheeses. (Journ. of Dairy Sci. Vol. 18. 1935. p. 599—601.)

Die von den Verff. bei Herstellung von Roquefort-Schimmelpulver gemachten Erfahrungen führten zu der folgenden endgültigen Methode:

Nährmedium. Vollkorn-Weizenbrot wird in Würfel von ungefähr ½ cm Seitenlänge geschnitten und ½—⅓ voll in Weithalsflaschen eingefüllt. Nach Ver-

schluß mit Watte wird im Autoklaven bei 1 Atm. 30 Min. lang sterilisiert. Im Anschluß ans Autoklavieren müssen die Flaschen sofort geschüttelt werden, um zu verhindern, daß die Brotstückchen in größeren Mengen zusammenkleben bleiben. Es hat sich als vorteilhaft erwiesen, das unsterilisierte Brot vorher mit einer geringen Menge Wasser zu benetzen, damit das sterilisierte Material nicht zu trocken wird.

Beimpfung. Man kann zweierlei Methoden anwenden. Die einfachere besteht in der Herstellung einer Sporensuspension in Wasser und Zufügung derselben zu dem sterilen Material. Das andere und mehr zu empfehlende Verfahren besteht darin, daß zunächst einige wenige Brotstückchen in einer großen Reagenzröhre sterilisiert und anschließend mit dem gewünschten Schimmelpilz beimpft werden. Nach eingetretener Sporulierung werden diese in die bereitgehaltenen Flaschen übertragen und mit den übrigen Brotstückchen gründlich durchgeschüttelt, um die Sporen allseits mit dem sterilen Material in Berührung zu bringen.

Bebrütung. Die beimpften Flaschen werden bei 21° C so lange bebrütet, bis reichliche Sporenbildung eingetreten ist (innerhalb von 8—12 Tagen). Während dieser Zeit werden die Flaschen gelegentlich wieder geschüttelt, um die Infektion aller Brotstückchen zu garantieren und das unerwünschte Zusammenkleben möglichst zu vermeiden.

Trocknen. Die mit Sporen bedeckten Brotwürfel werden auf eine über einem Rahmen gespannte Gaze ausgebreitet und in einem warmem Raum während 2—4 Tagen getrocknet.

Zermahlen. Nach vollständiger Trocknung erfolgt die Pulversierung des Brotes in einer kleinen Steinmühle. Kleinere Mengen können auch in einem Mörser zerstoßen werden. Zur Entfernung der größeren Teilchen wird das pulverisierte Material durch ein feines Sieb passiert.

Aufbewahrung. Das endgültig erhaltene Pulver wird in Zinnbüchsen gefüllt und bis zum Gebrauch an einem trockenen, kühlen Platz aufbewahrt.

Was den Sporengehalt des Pulvers betrifft, so zeigten sich Unterschiede von 30 Millionen bis 1500 Millionen pro g. In der Regel hatten die meisten Pulver Sporengehalte von 100—300 Millionen pro g, sofern zum Nachweis die Plattenmethode verwendet wurde (Tomatenagar).

K. J. Demeter (München-Weihenstephan).

Kretschmar, K., Ein Beitrag zur Sarzinafrage. (Wochenschr. f. Brauerei. Bd. 52. 1935. S. 281—285.)

Im Gegensatz zu der vielfach herrschenden Ansicht bringt eine Erhöhung des Säuregrades nicht immer die erstrebte Hemmung der Entwicklung der Biersarzina. So flockte z. B. eine vom Verf. isolierte Biersarzina in normaler Würze mit einem über 5,10 liegenden p_H. In diesem Fall kann bei sorgfältiger Arbeit beim Kühlen und Anstellen, sowie Sterilisation des Trubs eine Würzeinfektion ohne Folgen bleiben. Bei biologischer oder direkter Säuerung der Würze besteht die Gefahr, in die p_H-Zone von 5,10—4,95 zu kommen, in der diese Sarzina entflockt. Es wird dann gerade das Gegenteil erreicht von dem, was durch die Säuerung angestrebt wurde. Der entflockte Zustand hält während des ganzen Gärungsprozesses bis zum trinkfertigen Bier an, so daß normale und gesäuerte Biere gleichermaßen gefährdet sind. Sarzinarassen mit solchen Eigenschaften kommen vermutlich in der Brauerei häufiger vor, wenn sie auch wegen der Flockungsverhältnisse manchmal nicht leicht festzustellen sind. Zum Nachweis von Sarzinaspuren bewährte sich ein Zusatz von Würze aus Spelzen zum kleistertrüben Bier und unter Umständen Spelzenwürzegelatine. Alkohollösliche Trubstoffe, die in der Brauerei wegen ihres schlechten Einflusses auf Geschmack und Kälteempfindlichkeit wenig geschätzt sind, stärken interessanterweise die Abwehrkraft eines Bieres gegen Sarzina. Heuß (Berlin).

Weber, E., Fünfzehn Jahre Betriebsrevisionen. (Tageszt g. f. Brauerei. Bd. 33. 1935. S. 415—416.)

Nach den Erfahrungen des Verf.s steht das p_H der Ausschlagwürze und die Entwicklungsmöglichkeit der Sarzina in direktem Zusammenhang.

Es ist mehrfach gelungen, durch entsprechende p_H-Einstellung im Sudhaus mit Hilfe der biologischen Säuerung die Sarzinakrankheit mit Erfolg zu bekämpfen. Auf dem Gebiet der offenen Würzekühlung sind Fortschritte gemacht worden durch die Einführung der sterilen Belüftung mit verschiedenen Filtersystemen. Der Trub wird zur Ausschließung von Infektionsmöglichkeiten zweckmäßig sterilisiert, zur Versorgung des Betriebs mit reiner Anstellhefe ist eine der bewährtesten Methoden noch immer die Überführung nach Stockhausen-Coblitz, die Kühlung der Gärkeller geschieht zweckmäßig mit Hilfe gekühlter und entkeimter Luft. Im Gärkeller findet man vielfach ausgesprochen kalte Gärführung bei knapper Hefengabe und langer Gärdauer, die Nachgärung sucht man durch besondere Nachgärungshefen und Spänen zu fördern. In der Flaschenfüllerei hat sich das Prinzip der bürstenlosen Maschinen weitgehend durchgesetzt, die keimfreie Flaschen liefern. Die Vor- und Nachläufe, Abseih- und Abspritzbier, bekannte und gefürchtete Infektionsquellen, können heute durch Pasteurisieren in Krupp-fässern, Filtrieren durch Entkeimungsfilter oder mit Plattenapparaten sterilisiert werden. Auch auf dem Gebiet der praktischen Brauereibiologie sind große Fortschritte zu verzeichnen. Man kann heute mit Hilfe von Spezialmethoden Sarzinen schon in der Würze und im Wasser nachweisen. Biologisch nicht einwandfreies Wasser kann mit Hilfe des Chloratorverfahrens verbessert werden. Heuß (Berlin).

Stockhausen, F., Hoch- und niedrigvergärende Hefen und ihre Auswertung in Laboratorium und Praxis. (Tageszeitg. f. Brauerei. Bd. 33. 1935. S. 747—748.)

Die Frage der verschiedenen Vergärung der Hefen steht im Zusammenhang mit der Rasseveränderlichkeit der Hefe und mit ihrer Behandlung bei der Reinzucht und im Betrieb. Die Ansicht, daß Bruchhefen niedrig, Staubhefen hoch vergären, ist nicht allgemein gültig, es können auch umgekehrte Verhältnisse eintreten. Im Laboratorium läßt sich über die Vergärung einer Hefe nichts feststellen, da die Verhältnisse im Laboratorium und im Betrieb nicht vergleichbar sind. Die Wärmehaltung in den großen Gärgefäßen und die durch die Kohlensäure bedingte Umwälzung wirkt sich im Betrieb ganz anders aus als im Kleinversuch. In bezug auf die Neigung hoch- und niedrigvergärender Kulturhefen zur Flocken- und Bruchbildung sind zwar Rasseeigentümlichkeiten vorhanden, die bedingt sind durch innere Eigenschaften, wie Art und Menge der Enzyme. Diese inneren Eigenschaften werden aber stark beeinflußt durch die äußere Umgebung, wie Art und Material der Gärgefäße, Vorhandensein von gärungshemmendem Trub in der Würze, durch die infolge Verschiedenheiten in der Würzezusammensetzung verschiedenen Möglichkeiten in der Ernährung. In hohem Maße ist die Hefe abhängig von der Umwelt, letzten Endes ist die Zusammensetzung der Würze die eigentliche Ursache für die Höhe der Vergärung. In eiweißarmen Würzen wird meist hohe, in eiweißreichen niedrige Vergärung beobachtet.

Die Begriffe hoch- und niedrigvergärend gehen zurück auf die beiden Standardtypen Frohberg und Saaz. Neuere Untersuchungen haben überraschenderweise ergeben, daß die Saazer Hefe überhaupt keine eigentliche Kulturhefe ist, sondern sehr wahrscheinlich eine wilde Hefe, S. cratericus. Damit erzeugte Biere schmecken rauh und unbefriedigend.

Heuß (Berlin).

Stockhausen, F., Entwicklung von Organismen nach dem Abfüllen des Bieres. (Tageszeitg. f. Brauerei. Bd. 33. 1935. S. 331.)

Die nachträgliche Entwicklung von Hefenorganismen in endvergorenem Bier wird nicht, wie manchmal angenommen wird, durch nachträglichen Säureabbau von Dextrinen zu vergärbaren Zuckerstoffen herbeigeführt. Mit Hilfe von Plattenkulturen konnte man nachweisen, daß im abgefüllten Bier zunächst sogenannte Luftorganismen: Hefen, Schimmel u. a. in Erscheinung treten. Später nimmt der Gehalt an diesen Organismen ab, auf den Platten kommt mehr Bierhefe zur Entwicklung. Nach deren Rückgang setzt eine lebhafte Entwicklung von Sarzina ein, die vorher überhaupt nicht beobachtet worden war, aber schnell zur Trübung des Bieres führt. Die vorher anwesenden Hefeorganismen sind vermutlich der Autolyse verfallen und haben damit das Wachstum der Sarzina gefördert. Den bisher meist als unschädlich betrachteten Luftorganismen scheint nach diesen Befunden doch eine erhebliche bisher unterschätzte Bedeutung zuzukommen.

Heuß (Berlin).

Kolbach, P., Haußmann, G. und Wilharm, G., Über den Einfluß der biologischen Säuerung auf die Zusammensetzung von Würze und Bier. (Wochenschr. f. Brauerei. Bd. 52. 1935. S. 233—238, 241—246.)

Verff. geben eine zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der chemischen Untersuchung von Würzen und Bieren, die in mehrjährigen Versuchen über die biologischen Säuerungen mit Bacillus Delbrücki erhalten wurden. Heuß (Berlin).

Stockhausen, F., Neue Untersuchungen über das Elmocidverfahren. (Wochenschr. f. Brauerei. Bd. 52. 1935. S. 177—182, 185—191.)

Elmocid alkalisch war vor Jahren schon Gegenstand einer ausführlichen Veröffentlichung. Die gebrauchsfertige Lösung entspricht bekanntlich einer $^1/_{10}$ Normal-Natronlauge (= 0,4% NaOH) mit einem Gehalt von etwa 0,58% an Kochsalz, letzteres also ebenfalls $^1/_{10}$ normal. Es ist verschiedentlich die Meinung vertreten worden, daß auch Natronlauge allein, also ohne Zusatz von Kochsalz, den gleichen Desinfektionswert besitze, wie Elmocid alkalisch. In neuen umfangreichen Versuchen wurde festgestellt, daß leere Natronlauge, ohne irgendwelche Zusätze, eine bestimmte Wirkung auf die geprüften Organismenarten (untergärige Kulturhefe, Saccharomyces ellipsoideus II, Saccharomyces Pastorianus III und Biersarzina) ausübt. Aber erst durch Zusatz geringer, aber genau dosierter Mengen von Kochsalz, werden auch starke Verdünnungen von Natronlauge, die für sich allein kaum noch eine praktische Wirkung haben, zu einem sicher wirkenden Desinfektionsmittel gemacht. Das Elmocidverfahren ist deshalb für die Desinfektion in der Brauereipraxis geeignet. Seine keimtötende Wirkung reicht für die Bedürfnisse der Brauereipraxis vollkommen aus. Heuß (Berlin).

Mikrobiologie des Düngers, Bodens, Wassers und Abwassers.

Kudsin, I. und Pobereshnik, W., Zur Regulierung der mikrobiologischen Prozesse bei Düngeraufbewahrung. (Microbiology. Vol. 4. 1935. p. 90—101.) [Russisch.]

Zu Düngerproben, deren Gesamtstickstoff, Ammoniak- und Phosphor-

gehalt, Menge der trockenen Substanz und Zellulose, sowie deren Bakteriengehalt, vorher bestimmt worden waren, wurden 0,06, 0,2, und 0,6% Chlorpikrin zugesetzt. In einigen Versuchsserien wurde außerdem während der Aufbewahrung des Düngers alle zwei Wochen oder jeden Monat etwas Chlorpikrin hinzugefügt. Die Untersuchung zeigte, daß unter diesen Bedingungen der Abbau der organischen Stoffe unter bedeutend geringerem Verlust an Trockensubstanz verläuft. Der Ammoniakgehalt betrug nach sechsmonatlichem Aufbewahren 50%, während das Ammoniak in den Kontrollproben nach 6 Wochen völlig verschwunden war. Die Gesamtmenge der Bakterien nahm in den ersten 6 Wochen um das Dreifache ab, im weiteren Verlauf stieg die Bakterienzahl. Wiederholte Zugabe von Chlorpikrin (alle zwei Wochen) hemmt die mikrobiologischen Prozesse noch stärker. Indes hat solche „partielle Tindalisierung" auch Hemmung der Zellulosezersetzung zur Folge, was natürlich nicht wünschenswert ist. Nach Hinzufügen von Chlorpikrin nahm der Verlust des Gesamtstickstoffes des Düngers, im Vergleich zu den Kontrollproben, stark ab, der Phosphorverlust hörte gleichfalls fast völlig auf. Mikrobiologische Prozesse im Dünger lassen sich folglich mittels toxischer Stoffe regulieren, wodurch größere Mengen Mineralstickstoff erhalten werden können. A. Imšenecki (Moskau).

van Niel, C. B., A note on the apparent absence of Azotobacter in soils. (Arch. f. Mikrobiol. Vol. 6. 1935. p. 215—218.)

Aus verschiedenen Böden (Monterey Peninsula) konnte Azotobacter nicht durch Anreicherungskulturen nachgewiesen werden, obwohl die Böden durchaus azotobacterfähig schienen. Bei Zusatz von 0.00005% Natriummolybdat entwickelte er sich dagegen gut.

Es konnte weiter nachgewiesen werden, daß die Bodenkulturmethode nach Winogradsky durch ihre Azotobacter-Entwicklung zum Nachweis des Vorhandenseins oder Fehlens von Molybdän benutzt werden kann, somit einen Indikator für die Bodenfruchtbarkeit darstellt.

Rippel (Göttingen).

Conn, H. J., and Darrow, M. A., Characteristics of certain bacteria belonging to the autochthonous microflora of soil. (Soil Science. Vol. 39. 1935. p. 95—110.)

Nach Ansicht der Verff. ist die von Winogradsky so genannte autochthone Mikroflora des Bodens auf künstlichen Nährböden im Laboratorium nicht so schwierig zu züchten, wie oft angenommen wird. Die bei der direkten mikroskopischen Betrachtung des Bodens meist als kleine Kokken erscheinenden Mikroorganismen sollen nämlich identisch sein mit der von Conn bereits 1917 als „slow growers" und später als „punctiform-colony formers" bezeichneten Gruppe, die, wie sich später herausstellte, hauptsächlich aus Bacterium globiforme Conn besteht. Dieser Organismus bildet in den ersten Tagen der Kultur kleine Stäbchen, die sich aber bald zu Kokken abrunden. In vorliegender Arbeit sind einige physiologische Daten bezüglich des Kohlehydrat-Umsatzes näher untersucht worden. Der Glukoseverbrauch von Bact. globiforme war auf 0,2proz. Zuckerlösungen am größten. 50—60% des verbrauchten Zuckers wurden in CO_2 umgewandelt, weitere 25—35% in Zellsubstanz. Der Zucker wird demnach fast restlos ohne Bildung von Nebenstoffen verbraucht. Auch 70—80% des gebotenen Stickstoffes wurden in Zellsubstanz überführt. Da sich also die Bakterien der autochthonen Mikroflora des Bodens mit sehr

geringen Mengen an Kohlehydraten begnügen, sollen sie bei der bekannten Festlegung des Bodenstickstoffes in organischer Form eine große Rolle spielen.

Engel (Berlin).

Ssabinin, D. und **Minina, E.**, Mikrobiologisches Profil als zonales Merkmal. [Mikrobiologičeskij profil kak zonal'nyj priznak.] Die Arbeiten des III. Internationalen Bodenkundlerkongresses, III. Kommission. 1932. [Russ.]

Verff. untersuchten Lößböden und graue Erde in Mittelasien zu dem Zwecke, einen Zusammenhang zwischen dem mikrobiologischen Bodenprofil und seinem Gehalt an C und N festzustellen. In beiden Böden fand man Bakterien (auch aerobe) noch in einer sehr beträchtlichen Tiefe, welcher Umstand durch hohe Porosität und somit durch gute Durchlüftung des Lößes, sodann durch tiefes Eindringen der Wurzeln in derartigen Böden zu erklären ist. M. Gordienko (Berlin).

Schwezowa, O., Einige Besonderheiten in der Mikrobiologie der Roterde. [Nekotoryje ossobennosti w mikrobiologičeskoj detal'nosti krasnozjemow.] (Aus d. Arb. d. Allruss. Inst. f. landw. Mikrobiologie. Bd. 4. Folge 3.) [Russ.]

Verf.n untersuchte Roterde in der Umgebung von Batum (Kaukasus) unter verschiedenem Planzenbestand (Wald, Leguminosen, Teepflanzen usw.) und kam zu dem Ergebnis, daß Roterde überhaupt eine sehr schwache Nitrifikationstätigkeit aufweist. Während Proben von kastanienfarbigem Karbonatboden bis zu 160 000 nitrifizierende Bakterien je Gramm ergaben, waren von diesen in der Roterde vom Waldbestand nur 1200, in der von Teeplantagen 200 zu zählen. Durch Kalkgaben wird aber die nitrifizierende Tätigkeit der Roterde mit der Zeit bedeutend erhöht. Was die denitrifizierenden sowie die anaeroben Stickstoff-assimilierenden Bakterien anbetrifft, so sind diese in der Roterde reichlich vertreten.

M. Gordienko (Berlin).

Ssokolow, D., Über die Mikroorganismen der Untergrundschichten und über die biochemischen Verwitterungsfaktoren. [O mikroorganismach w podpočwennych slojach i o bio-chimičeskich faktorach wywetriwanija.] (Nachr. d. Akad. d. Wissenschaften d. USSR. Bd. 5. 1932. S. 693—712.) [Russ.]

Verf. weist auf die Mängel der sog. äolitischen Theorie der Lößbildung hin und versucht, diese durch die Ergebnisse seiner Untersuchungen der Lößböden im Gebiete von Magnitogorsk (Ural), wo er oft einen sehr gleichmäßigen Übergang des Lößes in Muttergestein feststellen konnte, zu widerlegen. Diese Tatsache zeugt also von einem genetischen Zusammenhang zwischen den beiden genannten Bildungen. Der gesamte Verwitterungsprozeß soll dabei unter lebhafter Beteiligung der Mikroorganismen der Untergrundschichten vor sich gehen, welchen Umstand Verf. ebenfalls durch seine Untersuchungen von Magnitogorsk-Lößböden, in denen er Bakterien noch in einer Tiefe von 12,5—17,5 m in großer Menge fand, zu beweisen sucht. Zahlenmäßig ausgedrückt, betrug in dortigen Böden die Bakterienmenge in einer Tiefe von 17,5 m noch immer 3 Millionen auf 1 g Boden, während die Bodenproben aus einer Tiefe von 1,5 m bis zu 18 Millionen auf 1 g aufwiesen. (Zur Bestimmung wurde die Methode von Winogradsky be-

nutzt.) — Bezüglich der chemischen Eigenschaften des Bodens wurde ein gewisser Zusammenhang zwischen der Menge der Bodenbakterien einerseits und dem Gehalt an Erdalkalien und Eisen anderseits festgestellt.

M. Gordienko (Berlin).

Jakowlewa, W., Biochemische Bodenprozesse im Zusammenhang mit der Bedeckung des Bodens. [Biochimičeskije prozessy w počwe w swjazi s mul'čirowanijem.] (Aus den Arbeiten der agrikultur-physiologischen und agrikultur-chemischen Abteilung der zonalen Versuchsstation Gorskaja. Die Chemisation der soz. Landw. Bd. 6. 1933. S. 24—30.) [Russisch.]

Man stellte Versuche auf ausgelaugter Schwarzerde an, die bezweckten, die Intensität der biochemischen Prozesse in oberen Bodenschichten (0—10, 10—20 cm) sowie die der Nitrifikation und die Veränderungen der Feuchtigkeit und der Bodenstruktur bei der Bedeckung des Bodens festzustellen. Dabei diente als Versuchspflanze Mais. Die Bedeckung des Bodens (mit Pappe) bewirkte eine bedeutende Anhäufung der CO_2- sowie der Nitratmenge, und führte zur Bildung größerer und fester Struktur-Aggregate des Bodens. In einer Tiefe von 10 cm konnte man überschüssige Feuchtigkeitsmengen feststellen. Auf den abgedeckten Parzellen erntete man nur 20,4 dz/ha gegen 27,8 dz/ha auf den nichtbedeckten, wobei das Verhältnis Korn zu Stroh auf den ersteren 0,7 : 1, auf den letzteren 1,08 : 1 betrug (welchen Umstand Verf. durch die Anhäufung der überschüssigen Feuchtigkeitsmengen auf den abgedeckten Parzellen erklärt).

M. Gordienko (Berlin).

Koschkin, M. L., Die Bedeutung des Ammoniaks für das Chlorbindungsvermögen des Wassers. 5. Mitt.: p_H des Wassers und Präammonisation. (Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. 117. 1935. S. 182—189.)

Das Chlorbindungsvermögen des Wassers nimmt mit steigendem p_H-Wert erheblich ab; bei p_H 2,8 wird 1½—3mal mehr Chlor gebunden als bei p_H 8,2. In präammonisiertem Wasser ist die Herabsetzung des Chlorbindungsvermögens stärker als in nichtpräammonisiertem Wasser. Auch die bakterizide Wirkung des Chlors wird (in präammonisiertem und in nichtpräammonisiertem Wasser) geringer mit Zunahme des p_H des Wassers. Die Verhinderung von Chlor-Phenolgeruch und -geschmack durch Präammonisation wird dagegen erst dann erzielt, wenn das p_H des Wassers etwa 7,0 oder mehr beträgt. Allein durch entsprechende Wahl der Ammonium- und Chlormengen und durch Verlängerung der Kontaktzeit bis auf eine Stunde und mehr läßt sich auch bei p_H 7,0 mit dem Präammonisationsverfahren eine befriedigende bakterizide Wirkung erzielen.

Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Barker, H. A., Photosynthesis in Diatoms. (Archiv f. Mikrobiologie. Bd. 6. 1935. S. 141—156.)

Für die Bewertung des Stoffumsatzes im Meere ist die Kenntnis der Leistung von Diatomeen und Dinoflagellaten (s. nachfolgendes Referat) von großer Wichtigkeit. Der Verf. kultivierte die beiden Diatomeen, die marine Nitzschia closterium und die Süßwasserform N. palea als Reinkulturen in See- oder Trinkwasser mit Nährsalzen nach Miquel und Allen-Nelson und Zusatz von 100 mg Natriumsilikat je 1 Liter. Bakterienfreiheit wurde kontrolliert. Die Versuche wurden im Warburg-

Manometer vorgenommen, und die Wirkung von Lichtintensität, Temperatur, CO_2-Konzentration und Alter der Kultur auf Photosynthese und Atmung untersucht.

Die Photosynthese ist ganz ähnlich der von Grünalgen (Chlorella). Der photosynthetische Quotient liegt fast genau bei 0,95. Verf. schließt daraus (da auch zweifellos Eiweißstoffe gebildet werden, die den Quotienten erniedrigen), daß die Fettbildung keine oder nur eine sehr geringe Rolle bei der Photosynthese der Diatomeen spielt. Bei hoher Assimilationstätigkeit kann die Fettbildung höchstens 10%, wahrscheinlich aber weniger der photosynthetischen Tätigkeit betragen. Rippel (Göttingen).

Barker, H. A., The culture and physiology of the marine Dinoflagellates. (Archiv f. Mikrobiologie. Bd. 6. 1935. S. 157—181.)

Als Reinkultur wurden kultiviert, und zwar länger als 1 Jahr: Prorocentrum micans Ehrenberg, P. gracile (?) Schütt, Peridinium 1, Peridinium 2 (ferner noch eine marine Cryptomonas), andere Formen als speziesreine Kulturen, darunter auch zwei heterotrophe Formen, von denen noch Oxyrrhis marina Dujardin, erwähnt sei, die länger als 1 Jahr ohne Überimpfung mit Nitzschia als Futter kultiviert werden konnte.

Als normale Nährlösung wurde altes Seewasser verwendet mit 0,01% Kaliumnitrat, 0,001% Dikaliumphosphat, 0,00001% Eisenchlorid und 2% Bodenextrakt.

Es ergab sich als besonders bemerkenswert, daß die Dinoflagellaten sehr nährstoffarme Medien lieben, namentlich äußerst geringe Mengen von Phosphor und Stickstoff. Die maximale Teilung liegt bereits bei einer Konzentration von 0,00001% Stickstoff (0,1 parts per million). Sie sind ferner völlig unfähig, organische Stoffe, sei es auch nur als Ergänzung ihres autotrophen Stoffwechsels zu verwenden, soweit es sich um autotrophe Formen handelt.

Hinsichtlich der Photosynthese, die im Warburg - Manometer untersucht wurde, ergab sich das gleiche Bild wie bei Diatomeen (s. vorstehendes Referat). Rippel (Göttingen).

Abshagen, H.-G. und Schinzel, A., Zum Nachweis virulenter Tuberkelbakterien in Kläranlagen. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 134. 1935. S. 375—383.)

Die Lebensfähigkeit der Tuberkelbakterien ist im Abwasser und Klärschlamm vermindert. Alle Versuche, eine Trennung von sporenbildenden Fäulniserregern und säurefesten Saprophyten auf kulturellem Wege herbeizuführen, scheiterten an der überlegenen Widerstandskraft und Wachstumsgeschwindigkeit der Apathogenen. Die Isolierung gelang aber mittels Tierversuch. Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz im allgemeinen.

Schwartz, M., Kartoffelkäferbekämpfung in Zahlen. (Nachrichtenbl. f. d. Dtsch. Pflanzenschutzdienst. Jahrg. 15. 1935. S. 62—63.)

Während der im Jahre 1934 bei Stade durchgeführten Bekämpfung des Kartoffelkäfers wurden insgesamt gefunden: 8466 Larven, 523 Käfer, 17 Eigelege und 18 Puppen. Der Umfang der befallenen Fläche betrug rund

1 preuß. Morgen, die Größe der dem Vernichtungsverfahren mit Benzol und Rohöl unterworfenen Fläche rund 8 Morgen. Verbraucht wurden 122 323 kg Benzol und Rohöl. 256 ha Kartoffel- und Tomatenland wurden abgesucht und mit Bleiarsenat bespritzt. Die Gesamtausgaben betrugen 108 678,64 RM. Dem steht gegenüber, daß durch die Aufhebung der 200 km Sperrzone Kartoffelsaatgut aus den hannoverschen Kreisen im Wert von 560 000 RM. in der Ausfuhrzeit 1934/35 nach Italien ausgeführt werden konnten. Goffart (Kiel-Kitzeberg).

Schwartz, M., Der Kartoffelkäfer vor der deutschen Grenze? (Nachrichtenbl. f. d. Deutsch. Pflanzenschutzdienst. 15. Jahrg. 1935. S. 89—90.)

Der Kartoffelkäfer ist in diesem Jahre erstmalig auch an mehreren Stellen in Belgien beobachtet worden. Der am nächsten der deutschen Grenze gelegene Herd bei Beeringen (Prov. Limburg) ist 48 km von der Rheinprovinz entfernt. Auch in Frankreich konnte sich der Käfer gegenüber dem letzten Jahre um 100 und mehr km in Richtung zur deutschen Grenze fortbewegen. Im Departement Bas-Rhin, dem früheren Elsaß, ist er in dem Ort Altviller festgestellt worden, der nur 22 km vom Saarland oder 72 km von der badischen Grenze entfernt liegt. Ein weiterer Fundort ist Wolfskirchen (Kanton Drullingen), dessen Entfernung vom Saarland 27 km, von der badischen Grenze 73 km beträgt.

Goffart (Kiel-Kitzeberg).

Sattler, Erneutes Massenauftreten der Runkelrübenmotte Phthorimaea (Lita) ocellatella Boyd. in Hessen. (Nachrichtenbl. f. d. Deutsch. Pflanzenschutzdienst. 15. Jahrg. 1935. S. 98—100.)

Im Jahre 1934 machte sich die Runkelrübenmotte in Hessen erneut stark bemerkbar, nachdem sie 1921 erstmalig in Deutschland beobachtet worden war. Der Schädling bildet 3 Generationen aus, von denen die letzte die Erkrankung und Schädigung an den Rüben verursacht. Die Eltern dieser Generation schlüpfen zwischen Ende August und Mitte September. Alsdann erfolgt die Eiablage. Die ausschlüpfenden Räupchen bohren sich in die Blattspreite ein und bilden kleine Minen. Später verlassen sie die Minen, begeben sich zur Stengelbasis der Herzblätter, die sie anfressen und mit Kot beschmutzen, so daß schließlich nur noch modrige Reste übrig bleiben. Die erwachsenen Raupen suchen zur Verpuppung trockene Stellen auf. Befallen werden außer Runkelrüben noch Zuckerrüben und rote Rüben. Der Befall war im Hauptschadgebiet 100 proz. Stark erkrankte Zuckerrüben hatten einen um 25% niedrigeren Zuckergehalt aufzuweisen. Wegen der Gefahr der Viehvergiftung wurden Bekämpfungsversuche mit arsenhaltigen Spritz- und Stäubemitteln nicht durchgeführt und nur schnelles Verfüttern der Rübenköpfe und Vernichten der Reste empfohlen. Die Massenvermehrung dürfte hauptsächlich auf die günstigen klimatischen Verhältnisse, die in den Monaten Juli und September der Jahre 1921 und 1934 gleich waren, zurückzuführen sein. Goffart (Kiel-Kitzeberg).

Rademacher, B., Erfahrungen über die wichtigsten Krankheiten der Ackerbohne und ihre Bekämpfung. (Dtsch. Landwirtsch. Presse. Bd. 61. 1934. S. 253—254, 275—276, 290.)

Verf. berichtet über Auftreten und Bekämpfung nachfolgender Schäd-

linge und Krankheiten der Ackerbohne: Blattrandkäfer (Sitona lineata), schwarze Bohnenlaus (Aphis fabae), gelber Thrips (Thrips flavus), Bohnenkäfer (Bruchus rufimanus), Fußkrankheiten, Rost (Uromyces Fabae), Brennfleckenkrankheit (Ascochyta sp.) und Mosaikkrankheit. Goffart (Kiel-Kitzeberg).

Brehm, Ein neues Frostschutzverfahren. (Dtsch. Landw. Presse. Bd. 62. 1935. S. 209, 1 Abb.)

Als Heizmaterial zum Frostschutz verwendete Verf. Sägespäne, denen ein besonderer Glühzünder Vomalyt der Fa. Chem. Werk Voma, Alfeld (Leine), zugesetzt wurde. Die zu schützenden Kulturen werden entweder mit einem Graben von 30 cm Tiefe und 20 cm Breite, der mit Sägespänen gefüllt wird, umgeben. Auf die Sägespäne wird die Zündmasse etwa 2 mm hoch gebracht und, nachdem sie mit Spiritus angefeuchtet ist, angezündet. Man kann aber auch in gewissen Abständen Gruben aufwerfen oder große Blechgefäße aufstellen. Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Walker, J. C., and Link, K. P., Toxicity of phenolic compounds to certain onion bulb parasites. (Bot. Gaz. Vol. 96. 1934/35. p. 468—484.)

Es wurde die Wirkung von 21 Phenolverbindungen auf folgende Schadpilze von Zwiebelknollen untersucht: Colletotrichum circinans, Botrytis allii Munn, Aspergillus niger Van T., außerdem ihr Einfluß auf den Getreideschadpilz Gibberella saubinetii (Mont.) Sacc. Alle Pilze wuchsen auf Czapeks Nährlösung, zu der die entsprechenden Verbindungen gegeben wurden. 3 Gruppen kamen zur Anwendung: Oxybenzole und Derivate, Benzoesäure und oxylierte Derivate, Protocatechusäure mit Derivaten. Mit zunehmendem Molekulargewicht scheint sich bei ausgesprochenen Orthoverb. die Giftigkeit zu erhöhen. Die Stellung der OH-Gruppen bei mehrwertigen Phenolen spielt für die Giftigkeit eine ausschlaggebende Rolle, so z. B. fällt die Giftwirkung von o- über p- nach m-verb. (Brenzkatechin-Hydrochinon-Resorcin). Ebenso ist es bei den 3-wertigen Phenolen: Pyrogallol wirkt stärker als Phloroglucin. Die Einführung von OH-Gruppen in die m-Stellung vermindert die Giftwirkung mit steigendem Atomgewicht. Die hier gemachten Erfahrungen ähneln denjenigen von Cooper und Mason an Bact. coli und fluorescens non-liquefaciens sehr. Methylierung des H in der OH-Gruppe verändert die Empfindlichkeit kaum, höchstens beim Verdünnen, als Beispiele sind Guajacol und Veratrol angeführt. Bei den Oxysäuren liegen die Verhältnisse analog, Benzoesäure ist am schädlichsten aus der 2. Reihe. Auffallend ist bei den Monooxybenzoesäuren jedoch, daß bei Methylierung des H in der OH-Gruppe die Giftigkeit stark gesteigert wird: Anissäure ist schon in viel geringeren Konzentrationen schädlich als p-Oxybenzoesäure. Von der Gallussäure, der Verbindung mit dem höchsten M.-Gew. aus dieser untersuchten Gruppe, werden beträchtliche Mengen vertragen. Die zum Vergleich mituntersuchte Oxalsäure steht zwischen Gallus- und Benzoesäure. Bei den Derivaten der Protocatechusäure zeigte sich, daß die Einführung von CH_3-Gruppen die spezifische Giftwirkung ebenso wie bei der Monooxybenzoesäure erhöht, allerdings geht sie auch hier bei stärkeren Verdünnungsgraden mehr zurück als bei der Protocatechusäure. Ihr Diacetylprodukt, Vanillinsäure, Veratrumsäure, Vanillin und der Aldehyd sind giftiger als die P-säure. Im allgemeinen konnten Verff. diese Reihe

aufstellen: C. c., G. s., B. a., A. n. Asp. nig. verträgt die höchsten Konzentrationen. Ferner wurden für die einzelnen Verbindungen die Grenzkonzentrationen ermittelt und dabei die Beobachtungen gemacht, daß Guajakol, Vanillin- und Veratrumsäure usw. als Stimulantien auftreten können.

Skallau (Berlin).

Schädigungen der Pflanzen durch physikalische, chemische und physiologische Einflüsse.

Caldwell, J., Spurious cucumber „mosaic" due to copper poisoning. (Journ. of Ministry of Agric. Vol. 42. 1935. p. 97—98, 1 fig.)

Verf. beobachtete zuerst 1934 an Gurkensämlingen Erscheinungen, die der Mosaikkrankheit ähnelten. Übertragungsversuche waren jedoch erfolglos. Ebenso konnten pilzliche oder tierische Krankheitserreger nicht ermittelt werden. Es stellte sich heraus, daß Spuren von Kupfer die Ursache waren. Ein Teil der Töpfe war nämlich vor dem Gebrauch in einem kupfernen Kessel gekocht worden, der ursprünglich verzinnt, dann aber mit unverzinntem Kupferblech ausgebessert war. Pflanzen, die in Töpfen gezogen wurden, die in einem eisernen Kessel ausgekocht waren, zeigten die Erscheinung nicht.

Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Harrison, K. A., Mouldy cores in Gravenstein apples. (Scientific Agriculture. Vol. 15. 1935. p. 358—370.)

Im Annapolis-Tal werden alljährlich große Verluste durch vorzeitiges Abwerfen der Gravensteiner Äpfel hervorgerufen. Ein großer Teil dieser Früchte hat am Blütenende eine in das Innere führende Öffnung und ein faules Herz. Verf. hat aus diesem vorwiegend Alternaria- und Fusarium-Spezies isolieren können, vereinzelt auch Cladosporium- und Penicillium-Spezies. Er hält diese aber nicht für die Ursache der Erscheinung, sondern für zufällige Begleiter. Die kranken Früchte hatten im Durchschnitt ein schwereres Gewicht als die gesunden. Die Krankheitserscheinung steht in enger Beziehung zu einem „offenen Herz", womit Verf. die zwischen dem Fruchtgehäuse und dem Kelch bestehende Verbindung bezeichnet. Diese Öffnung führt er auf schnelles Wachstum während irgendeiner Entwicklungsperiode der Frucht zurück, welche Gewebezerreißungen zur Folge hat. Eine enge Beziehung besteht weiter zwischen diesen beiden Erscheinungen und vorzeitiger Verfärbung der Frucht, wenn sie auch für 25—40% der Erkrankungen nicht zutrifft. Dagegen konnte 1933 keine Beziehung zum Samengehalt und zum vorzeitigen Abwerfen der Frucht gefunden werden. Ebensowenig kann mangelhafte Bestäubung die Ursache der Fäulnis sein. Diese wird in zu günstigen Wachstumsbedingungen gesucht.

Braun (Berlin-Dahlem).

Meyer-Hermann, K., Erfolgreiche Bekämpfung der Herz- und Trockenfäule der Rüben. (Deutsche Landwirtschaftl. Presse. 62. Jahrg. 1935. S. 133 und Ergänzung S. 282.)

Die Bekämpfung erfolgte mit Borax in Gaben von 5, 10, 15, 20, 25, 30 und 40 kg je ha, der mit 1 dz 40 proz. Kali gemischt breitwürfig ausgestreut wurde. Schon bei der 5-kg-Gabe machte sich eine deutliche Verminderung der Krankheit bemerkbar. Die optimale Wirkung wurde bei der 15- und 20-kg-Gabe beobachtet, die vor der 1. oder 2. Hacke zu geben und unmittelbar hinterher einzuhacken ist. Mit ammoniakalischen Düngern darf Borax nicht vermischt werden.

Goffart (Kiel-Kitzeberg).

Schädigungen der Pflanzen durch Pilze, Bakterien und filtrierbare Vira.

Bates, G. H., and Martin, L. D., Sulphuric acid spraying of potato haulm to prevent late infection of the tubers with blight. (Journ. of Ministry of Agric. Vol. 42. 1935. p. 231—235.)

Die Infektion der Kartoffelknollen mit Phytophthora erfolgt durch Sporen, die von den Strünken abgewaschen werden. Aus diesem Grunde werden die Strünke vielfach ausgerissen und verbrannt. Bei dem Ausreißen gelangen aber vielfach die Sporen doch noch in den Boden. Verff. versuchten daher die Strünke durch Bespritzen mit Schwefelsäure zu vernichten. Angewendet wurden 10 und 20 proz. Lösungen einer 77 proz. Schwefelsäure und zwar 100 Gallonen (454,35 l) auf 1 Acre (40,77 a). Es zeigte sich, daß selbst bei dem schwachen Auftreten der Phytophthora im Jahre 1934 noch ein merklicher Erfolg erzielt werden konnte. Der Mehrerlös betrug für 1 Acre 11 sh 1 d. Weiterhin ist es dem Kartoffelerzeuger möglich, durch die Schwefelsäurebehandlung die Kartoffeln zu einer ihm passenden Zeit zur „Reife" zu bringen. Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Hart, H., and Forbes, I. L., The effect of light on the initiation of rust infection. (Phytop. Vol. 25. 1935. p. 715—725, 1 fig.)

Verff. stellten den Einfluß von Licht und Dunkelheit auf das Eindringen und die Entwicklung von Puccinia triticina, P. graminis tritici, P. coronata, P. sorghi, P. helianthi, P. antirrhini und Uromyces appendiculatus fest. Dunkelheit z. Zt. der Impfung und während der ersten Zeit der Infektion verminderte die Verbreitung und die Stärke der Infektion bei P. graminis tritici und U. appendiculatus. Dunkelheit hatte keinen Einfluß bei P. triticina und P. antirrhini. Die Verbreitung der Infektion bei P. sorghi und P. helianthi wurde durch Dunkelheit gehemmt und die Infektionsstärke war ein wenig geringer. Dunkelheit beeinflußte weder die Verbreitung noch die Infektionsstärke bei P. coronata auf der Sorte Gopher, dagegen trat P. coronata auf der Sorte Victory bei Dunkelheit nicht so stark auf. Der Einfluß der Dunkelheit bei P. graminis tritici war je nach der verwendeten Weizensorte und verwendeten Rostform verschieden. Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Fischer, G. W., Comparative studies of certain cultures of Puccinia rubigo-vera and Puccinia tomipara on wild grasses. (Phytop. Vol. 25. 1935. p. 657—685, 3 figs.)

18 Spezies und Varietäten der Gattungen Agropyron, Elymus, Hordeum und Hystrix wurden auf ihr Verhalten gegen 8 Kulturen von Puccinia rubigo-vera untersucht. Die Versuche ergaben, daß die Kulturen physiologisch verschieden waren. Einige Kulturen von P. rubigo-vera unterschieden sich von anderen in bezug auf Größe der Sporen. Kulturen, die die kleinsten Uredosporen aufwiesen, hatten aber nicht die kleinsten Teleutosporen. Versuche, Beziehungen zwischen Sporengröße und Spezialisierung für bestimmte Wirtspflanzen festzustellen, waren ohne Erfolg. Die Vielzelligkeit der Teleutosporen von P. tomipara blieb durch 2 Generationen hindurch konstant. Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Abgeschlossen am 29. April 1936.

Zentralblatt für Bakt. etc. II. Abt. Bd. 94. No. 14/18.

Ausgegeben am 4. Juli 1936.

Differenzierung der in Säureweckern vorkommenden Milchsäurebakterien.

[Aus dem Laboratorium für Mikrobiologie der Technischen Hochschule in Delft, Holland.]

Von **W. C. Smit.**

Mit 8 Abbildungen im Text.

I. Einführung.

Die für die Butterherstellung fast unentbehrlich gehaltenen Säurewecker bilden eine Mischkultur von Milchsäurebakterien in Milch. Die Versuche, mit Hilfe von Reinkulturen musterhafte Butter zu verfertigen, sind alle fehlgeschlagen; namentlich mit Hinsicht auf das so sehr gewünschte Aroma; in der Regel — mit sehr spärlichen Ausnahmen — sind die Bakterien, welche eine genügende Menge Säure zu bilden imstande sind, außerstande, gut wahrnehmbare aromatische Produkte zu erzeugen.

Unter Anwendung der von Orla-Jensen eingefuhrten Nomenklatur darf man sagen, daß ein guter Säurewecker aus einer Milchkultur von Streptococcus- und Betacoccus-Arten besteht. Diese zwei Gruppen, von denen die erste hauptsächlich die Bildung der Säure zustande bringt und die letzte die aromatischen Nebenprodukte liefert, leben in Symbiose. Übersteigt die Wasserstoffionenkonzentration einen gewissen Wert ($p_H \pm 4{,}5$), so wird keine bedeutende Menge von aromatischen Produkten gebildet[1]). Die Streptokokken sind „homofermentativ“, d. h. sie bilden von den Kohlehydraten fast quantitativ Milchsäure; die Betakokken sind demgegenüber „heterofermentativ“, d. h. sie bilden neben Milchsäure bedeutende Mengen flüchtiger Produkte, Kohlensäure, Essigsäure und die spezifischen Aromastoffe, hauptsächlich Diazetyl. Während die Streptokokken ziemlich leicht zu isolieren sind und auf einigen allgemein gebrauchten Nährböden (wie z. B. Malzagar) zur Entwicklung kommen, ist dies dagegen weniger der Fall mit den Betakokken oder Aromabakterien. Diese letzten sind noch anspruchsvoller als die Streptokokken. Da ihre Kolonien, wenn diese einmal gebildet sind, sich nicht erheblich von denjenigen der Streptokokken unterscheiden, sind sie deshalb lange Zeit übersehen worden. In Milch entwickeln sie sich als Reinkulturen nur sehr langsam. Ein gutes Wachstum ist möglich, wenn gewisse Stoffe hinzugefügt werden, z. B. Hefeautolysat oder Pflanzenauszüge. Bei der Isolation kann man diese Tatsachen benutzen; so verwenden Knudsen und Sørensen[2]) einen Nährboden, dem Hefeautolysat zugesetzt

---

[1]) M. B. Michaelian, R. S. Farmer and B. W. Hammer, Agr. Exp. Stat., Iowa, Res. Bull. 155. 1933.

[2]) S. Knudsen og A. Sørensen, Bidrag til Syrevaekkernes Bakteriologi. Kgl. Veter. og Landbohøjskole, Aarsskr. 1929, 64; id.: Zentralbl. f. Bakt., Abt. II, Bd. 79. 1929. S. 75.

worden ist und in dem auch die Aromabakterien ziemlich große Kolonien zu bilden vermögen (Abb. 3).

Die Betakokken können in eine Spezies zusammengefaßt werden, nämlich Betacoccus cremoris (Knudsen et Sørensen). Knudsen und Sørensen unterscheiden innerhalb dieser Art 2 Typen, nämlich die a-Form und die x-Form. Die x-Formen entsprechen Storch's x-Bakterien und sind am wenigsten aktiv, sie sind z. B. außerstande, Maltose zu vergären, während die aktiveren a-Formen dazu wohl imstande sind. Die a-Formen scheinen allgemeiner verbreitet zu sein als die x-Formen, es sind auch diese Formen, die in den hierunter folgenden Versuchen verwendet worden sind.

Die hier verwendeten Streptokokken sind Streptococcus lactis und Streptococcus cremoris. Eine ausführliche Beschreibung dieser beiden Arten findet man in der Monographie Orla-Jensens über die Milchsäurebakterien[1]).

II. Differenzierung von Streptokokken und Betakokken.

Durch mikroskopische Beobachtung allein ist es unmöglich zu bestimmen, ob Streptokokken oder Betakokken vorhanden sind. Reinkulturen in Milch weisen unter gewissen Umständen bei Streptokokken große Bakterien auf, dagegen bei Betakokken kleine. Es würde jedoch leichtfertig sein, aus diesen Bildern Folgerungen ziehen zu wollen. Betakokken kommen sowohl in Streptococcus-Gestalt wie in Diplococcus-Gestalt vor (Abb. 1 und 2). Die

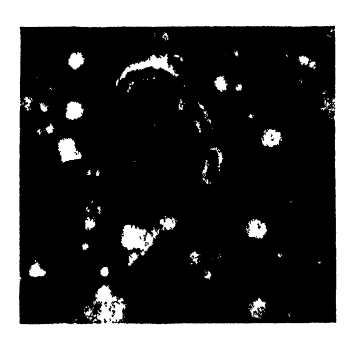


Abb. 1.

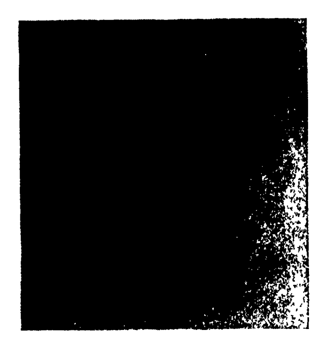


Abb. 2.

Abb. 1. Betacoccus cremoris. Reinkultur in Milch. Färbung nach Gram. Vergr. etwa 1800fach.
Abb. 2. Betacoccus cremoris. Wie Abb. 1.

Morphologie der Zellen und Zellverbände der Streptokokken darf als bekannt angenommen werden. (Man sehe die zahlreichen ausgezeichneten Abbildungen in Orla-Jensens Abhandlung, l. c.) Auch gestattet die große Mehrzahl der üblichen Nährböden es nicht, an der Form, Größe oder Wachstumsart der Kolonien zu erkennen, mit welcher von beiden Bakterienarten man zu tun hat. So beschreiben Orla-Jensen und Mitarbeiter[2]) ihre vergeblichen Versuche, Betakokken neben Streptokokken zu identifizieren.

[1]) S. Orla-Jensen, The Lactic Acid Bacteria. København 1919.

[2]) S. Orla-Jensen, A. D. Orla-Jensen et B. Spur, Les bactéries d'arome du beurre. Le Lait. T. 6. 1926. p. 161; id.: Journ. of Bact. Vol. 12. 1926. p. 333.

Der Gedanke liegt nahe, den Unterschied im Säurebildungsvermögen der beiden Bakterienarten diesem Zweck nutzbar zu machen, und den zur Isolierung zu verwendenden Platten einen Indikator wie Lackmus hinzuzufügen. In flüssigen Nährmedien ist dieser Indikator für die Erkennung von eingeimpften Kolonien sehr gut zu verwenden, nach Orla-Jensen ist ein derartiges Vorgehen unbrauchbar. Dieser Forscher versuchte auch einen Nährboden zusammenzusetzen, in welchem die Betakokken gut, die Streptokokken spärlich zur Entwicklung kommen sollten, hierbei benutzte er die Fähigkeit, von Betakokken Rohrzucker zu vergären, Streptokokken sind nämlich dazu nicht imstande. Die erwarteten Resultate blieben jedoch aus. Auch ich habe vor allem versucht, die Fähigkeit der Streptokokken, in einem Laktose enthaltenden Nährboden mehr Säure zu produzieren als die Betakokken, dazu zu benutzen. Die Kolonien sollten erwartungsgemäß wiederzuerkennen sein, falls ein passender Indikator zugefügt worden war. Erst

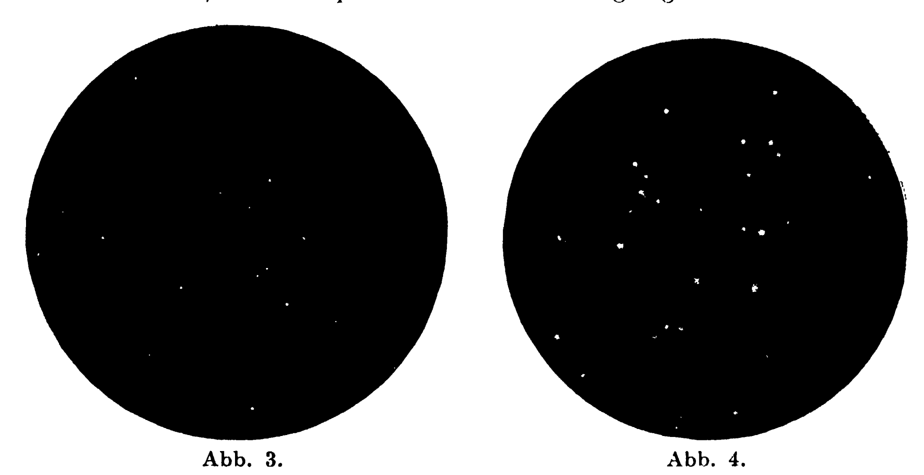


Abb. 3. Abb. 4.

Abb. 3. Aussaat von einem Molkereisäurewecker in Molken-Hefeautolysat. (Verdunnung 1 : 1,3 Mill.)

Abb. 4. Aussaat von demselben Säurewecker in Milchpulveragar. (Verdunnung 1 : 4,2 Mill.)

wurde Lackmus gebraucht, was aber nicht die gewünschten Resultate lieferte. Später wurden in einem farblosen Nährboden von Milchpulveragar mehrere Indikateren angewandt, die einen Umschlag geben in der Nähe von p_H 5,0; die Streptokokken säuern den genannten Nährboden stärker (p_H 4,0 und darunter) und müßten so von den Betakokken, welche nicht so weit kommen, unterschieden werden können. Anfänglich schien es, als ob Methylrot verwendbar sei, doch beschränkte sich das später auf einige wenige Fälle. Es wurde deshalb in der Folgezeit ganz auf den Gebrauch von Indikatoren als Mittel zur Differenzierung von Betakokken und Streptokokken in festen Nährböden verzichtet.

Zwecks Isolierung der Betakokken aus Säureweckern wurde fast immer Molken-Hefeautolysat-Agar (m. h. a. a.) verwendet, hergestellt nach Vorschrift von Knudsen und Sørensen (l. c.). Aus Abb. 3 ist ersichtlich, daß die Kolonien alle fast gleich groß und von derselben Form sind, und zwar sowohl die der Streptokokken als die der Betakokken. Für die direkte Differenzierung ist dieser Nährboden daher unbrauchbar. Besser

zeigte sich der Nährboden, vorgeschlagen von Ayers und Mudge[1]), d. h. Milchpulveragar (m. p. a.), und zwar der Boden „A".

Bereitung des Nährbodens.

Die Herstellung dieses Nahrbodens geschieht in der folgenden Weise:
Bestandteile fur 1 l Nahrboden:

(a) { 5 g Magermilchpulver; 1 g sekundares Natriumphosphat (Sorensens Phosphat, $Na_2HPO_4 + 2 H_2O$) } in 250 ccm dest. Wasser

(b) { 5 g Pepton; 3 g Extrakt } in 250 ccm dest. Wasser

Mische (a) und (b) und füge 500 ccm doppelstarken (3%) ausgewaschenen Agar hinzu.

Ausführliche Vorschriften für die Herstellung von 1 l Nahrboden:

(a) Milchpulverlösung.

Die Vorschriften mussen genau befolgt werden.

Man braucht Milchpulver, verfertigt nach dem Krause- („spray") Verfahren und macht die folgenden Losungen:

(1) 5 g Milchpulver
20 ccm dest. Wasser

(2) 1 g Sørensens Phosphat
5 ccm dest. Wasser

Bringe 5 g Magermilchpulver in 20 ccm kaltem. dest. Wasser in ein kleines Becherglas. Rühre durch, so daß alles sich gut lost. In einem anderen Becherglas lose 1 g Sørensens Phosphat in 5 ccm dest. Wasser (erwarme ein wenig). Fuge die Phosphatlosung (2) zu der Milchpulverlosung (1). Setze das Becherglas mit der Mischung von (1) und (2) in ein Wasserbad mit Wasser von etwa 30° C und erhitze bis etwa 60° C in etwa 10 Min. Setze die Erhitzung fort, bis ein Prazipitat entsteht und erhitze danach in einem Dampftopf 5 Min. oder bis das Präzipitat weiß erscheint. Verdünne die Losung ein Drittel mit dest. Wasser und erhitze wieder 5 Min. Gieße die heiße Losung auf ein Filterpapier (zuerst nur die Flussigkeit) und wasche nach mit wenig dest. Wasser. Ergänze das Filtrat bis zu 250 ccm. Das ergibt die Losung (a).

(b) Pepton-Extraktlösung.

Lose 5 g Pepton in dest. Wasser (oder bei Gebrauch von der Losung nach Orla-Jensen, nehme soviel Kubikzentimeter-Losung, daß der Stickstoffgehalt des Nahrbodens dem Gehalt des Bodens bei Gebrauch von festem Pepton entspricht) und 3 g Liebig-Extrakt und erganze bis auf 100 ccm, erhitze dazu 20 Min. im Dampftopf. Filtriere, bis eine klare Flussigkeit entsteht und erganze bis zu 250 ccm. Dies gibt Losung (b).

Die Losungen (a) und (b) werden gemischt, so bekommt man 500 ccm. Hierzu fugt man 500 ccm doppelstarke (3%) ausgewaschene Agarlosung.

Merkwürdig ist, daß in diesem Nährboden so viele Kolonien zur Entwicklung kommen, etwa die dreifache Anzahl von derjenigen in Molken-Hefeautolysat-Agar (Abb. 3, m. h. a. a., Verdünnung 1 : 1,3 Million; Abb. 4, m. p. a., Verd. 1 : 4,2 Mill.; die Anzahl der Kolonien ist in beiden Fällen fast gleich, geimpft ist mit demselben Säurewecker, Alter beider Platten dasselbe, beide bei 25° C bebrütet).

Weiter zeigt sich, daß, wenn wir eine Aussaat machen, in Milchpulveragar von einer Kultur, welche sowohl Streptokokken als Betakokken enthält, ein Teil, meist die Mehrzahl, von einem sich durch eine Trübung bemerkbar machenden Hof („Halo") umgeben ist, während der Rest der Kolonien — in der Regel die kleineren — keine Trübung des die Kolonien umgebenden Nährbodens verursacht. In Abb. 4 (m. p. a.) zeigt die Mehrzahl der Kolonien diesen Hof, während in Abb. 3 (m. h. a. a.) von einem solchen bei keiner Kolonie etwas zu bemerken ist. Wenn wir diese Kolonien näher prüfen, zeigt sich, daß die mit Höfen versehenen Kolonien von Streptokokken

[1]) S. H. Ayers and C. S. Mudge, Journ. of Bact. Vol. 5. 1920. p. 565.

stammen, während diejenigen ohne Hof aus Betakokken bestehen. Offenbar hat die große Menge der durch die Streptokokken gebildeten Säure diese Trübung verursacht, wahrscheinlich durch Koagulation der ursprünglich gelösten Eiweißkörper. Dieses Phänomen ist schon von Beijerinck[1]) beschrieben worden.

Es hat sich nun gezeigt, daß es für eine deutliche Differenzierung durch den Nährboden von größter Wichtigkeit ist, Sorge zu tragen für eine richtige Zusammensetzung und Herstellung des Nährbodens und es zeigt sich, daß besonders das verwendete Pepton von entscheidendem Einfluß ist. Nur zu gebrauchen sind die Peptonarten, welche hergestellt sind aus Kasein. Von zwei käuflichen Kaseinpeptonarten, Pepton von Merck und Bactotrypton von Difco, war erstere am besten geeignet. Die mit diesen Peptonen erhaltenen Resultate wurden aber übertroffen durch selbstverfertigtes Pepton, bereitet nach der Vorschrift Orla-Jensens[2]). Ayers und Mudge verwenden für Medium „A" 0,5% Pepton. Man hat darauf zu achten, daß

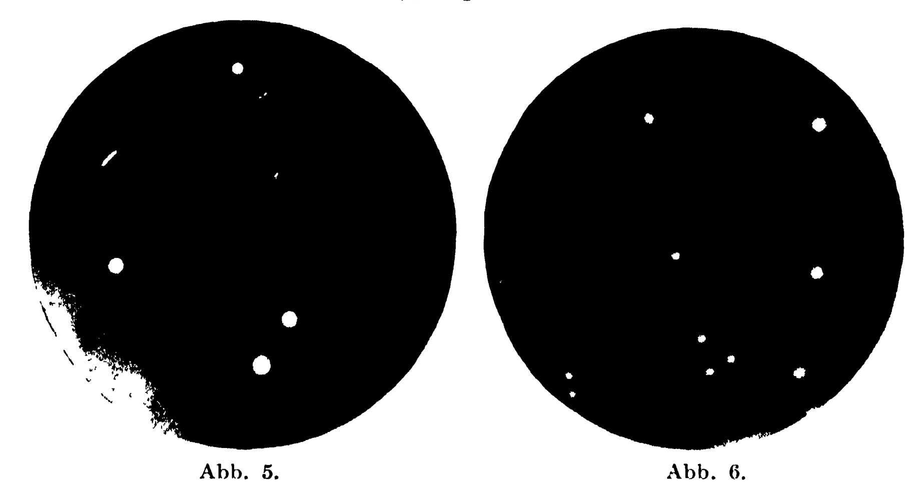


Abb. 5. Abb. 6.

Abb. 5. Streptococcus lactis, Reinkultur. Aussaat in Milchpulveragar.
Abb. 6. Streptococcus lactis. Wie Abb. 5.

der Stickstoffgehalt des Nährbodens bei Anwendung von selbstverfertigtem Pepton übereinstimmt mit dem Stickstoffgehalt des Nährbodens von Ayers und Mudge. Der Stickstoffgehalt der käuflichen Peptone beträgt etwa 14%.

Der verwendete Agar ist nach Vorschrift von Ayers und Mudge ausgewaschener Agar, wovon 1,5% genommen wird. Für unseren Zweck zeigt es sich, daß es eher besser ist, etwas weniger als etwas mehr Agar zu verwenden wie vorgeschrieben ist. Die Wasserstoffionenkonzentration des Nährbodens vor der Sterilisation war etwa 7,0. Ein höheres p_H war sehr schädlich für die Entwicklung der Milchsäurebakterien. Anfänglich wurde erwartet, daß ein etwas höheres p_H für eine scharfe Differenzierung Vorteile haben würde. Aus obengenanntem Grund war diese Abänderung aber unerwünscht. Außerdem soll der Nährboden in möglichst frischem Zustande gebraucht werden, nach 3—4 Wochen ist er zwecks deutlicher Differenzierung nicht mehr zu verwenden.

---

1) M. W. Beijerinck, Verzamelde Geschriften. Deel 5. blz. 52.
2) S. Orla-Jensen, The Lactic Acid Bacteria. p. 6.

Es muß betont werden, daß infolge des geringen Agargehaltes des Nährbodens dieser so weich ist, daß Strichkulturen auf demselben nicht ausführbar sind.

Die Brauchbarkeit des Nährbodens in der beschriebenen Form und Zusammensetzung wird an folgenden Beispielen deutlich gemacht:

a) Von einem Molkereisäurewecker wurde nach starker Verdünnung eine Aussaat in Milchpulveragar gemacht (Abb. 4). Ist die Verdünnung genügend groß gewählt, so ist unmittelbar zu bestimmen, welche von den geformten Kolonien einen Hof bilden und welche nicht. Ist die Zahl der Kolonien zu groß, so entstehen große trübe Stellen, in denen etwaige nicht-Höfe-bildende Kolonien sich verbergen können, welche also nicht als solche zu erkennen sind. Etwa 20 Kolonien — sowohl solche mit als auch ohne Hof — wurden vom Agar in Lackmusmilch überimpft. Es zeigte sich, daß die Milch ausnahmslos in den Kulturröhrchen, in der die Höfe-bildenden Kolonien geimpft worden waren, nach 1—2 Tagen geronnen war, während

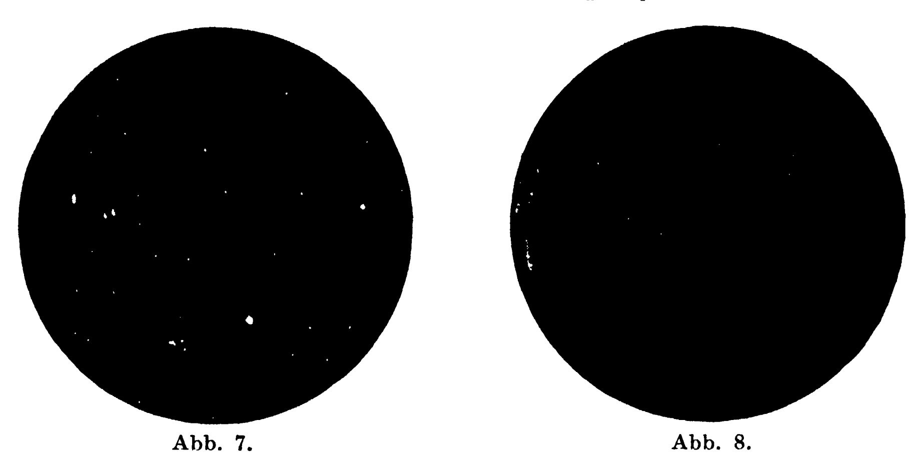


Abb. 7. Abb. 8.

Abb. 7. Betacoccus cremoris, Reinkultur. Aussaat in Milchpulveragar.
Abb. 8. Betacoccus cremoris. Wie Abb. 7.

der Lackmus reduziert war; bei den Kulturen, in welche die Hof-freien Kolonien geimpft worden waren, hatte sich in diesem Zeitraum wenig geändert, der Lackmus hatte bisweilen einen Stich ins Rötliche angenommen. Hieraus darf geschlossen werden, daß die Kolonien mit Höfen aus Streptokokken, die Kolonien ohne Höfe aus Betakokken bestehen.

b) Von etwa 10 Reinkulturen von Streptokokken in Milch wurde in Milchpulveragar eine Aussaat gemacht. Alle gebildeten Kolonien besaßen Höfe (Abb. 5 und 6).

c) Von etwa 10 Reinkulturen von Betakokken in Milch wurde wiederum im gleichen Milchpulveragar eine Aussaat gemacht. Alle Kolonien waren ohne Trübung (Abb. 7 und 8).

Aus den Abbildungen ergibt sich der große Unterschied in Wachstumsweise zwischen Streptokokken- und Betakokkenkolonien in demselben Nährboden recht deutlich. Die Platten sind alle gleich alt und bei 25° C bebrütet gewesen. Liegen mehrere Streptokokkenkolonien nahe beieinander, so werden sie sämtlich von einer Trübung umgeben, unter gewissen Umständen trübt sich die ganze Platte. Alle Kolonien von Streptokokken haben Linsen- bis

Kugelform, die der Betakokken bisweilen eine mehr unregelmäßige Gestalt und machen den Eindruck, als seien sie durch Verwachsung zweier senkrecht zueinander stehender Kolonien entstanden.

Mit Hilfe dieses Nährbodens ist es also möglich, direkt die Zusammensetzung eines Säureweckers von der Platte abzulesen. Die einzelnen Kolonien brauchen nicht näher geprüft zu werden.

Zum Schluß möchte ich es nicht unterlassen, Herrn Prof. Dr. A. J. Kluyver für seine wertvollen Anregungen meinen besten Dank auszusprechen und ebenso der Molkereianstalt Fa. B. Veth & Co. für die freundliche Überlassung ihrer Säureweckerkulturen.

Zusammenfassung.

Nach einer kurzen allgemeinen Besprechung über die Bakterienflora der Säurewecker wird eine Methode angegeben zur Differenzierung von Streptokokken und Betakokken, mittels einfacher Aussaat in einem festen Nährboden.

Beitrag zur Kenntnis der Alkalibildner in Rohmilch[1]).

[Aus dem Bakteriologischen Institut der Preußischen Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, Kiel.]

Von **Wennemar Storck**, Duisburg.

Mit 2 Abbildungen im Text.

A. 1. Einleitung und Literaturübersicht.

Die milchwirtschaftlich wichtigen Bakterien teilt man bekanntlich in Säurebildner und Nichtsäurebildner ein. Die Nichtsäurebildner bestehen wieder aus zwei Untergruppen: den indifferenten Nichtsäurebildnern und den Alkalibildnern. Letztere sollen hier ausschließlich behandelt werden. Unter Alkalibildner sind solche Bakterien zu verstehen, welche die Fähigkeit besitzen, Eiweiß unter alkalischer Reaktion zu spalten. Alkalibildner treten, wie Henneberg bereits mitteilt und Versuche einwandfrei ergaben, hauptsächlich im Winter und an kalten Tagen auf, also bei solchen Temperaturen, die ein Wachstum und eine Vermehrung der Milchsäurebakterien und somit auch ihre für andere Bakterien schädlichen Stoffwechselprodukte sehr stark hemmen. Im Sommer, der für die Lebensbedingungen der Milchsäurebakterien günstige Temperaturen mit sich bringt, überragten letztere bei der Plattenkeimzählung bei weitem die Alkalibildner, die durch die Milchsäurebakterien im Wachstum unterdrückt wurden. Die graphischen Darstellungen, die fortlaufend eigene Keimzählungen für die Dauer von zwei Jahren bringen, demonstrieren anschaulich das Verhältnis der Milchsäurebakterien zu den Nichtsäurebildnern. In jeweils den ersten Jahresvierteln waren die Alkalibildner in der Überzahl. Der Wendepunkt zum gehäufteren Vorkommen der Säurebildner ist beide Male der April; nun behaupten sie das Feld bis Ende Oktober—Anfang November, um es dann

---

[1]) Als Dissertation angenommen von der Philosophischen Fakultät der Christian-Albrecht-Universität zu Kiel.

wieder an die Nichtsäurebildner abzutreten, und somit auch die Alkalibildner wieder aufkommen zu lassen (siehe Darstellungen).

Die alkalibildenden Organismen gelangen auf verschiedenen Wegen in die Milch. Einmal auf primärem, durch Infektion im Euter selbst, da nach Henneberg gewisse Alkalibildner zur Innnenflora des Euters gehören. Viele andere, wohl hauptsächlich in Frage kommende Infektionsmöglichkeiten sind sekundärer Art, durch Staub, Wasser, Kuhkot, unsauberes Melken, nicht ganz saubere Kannen usw. Da die Alkalibildner nicht allein durch ihre proteolytischen Eigenschaften, sondern auch durch Geschmacks- und Geruchsveränderungen und Schleimbildung die Milch in ihrem Werte herabsetzen, manchmal sogar zu jedem Gebrauch und Genuß unfähig machen, sind sie als nicht zu unterschätzende Erreger von Milchfehlern anzusehen.

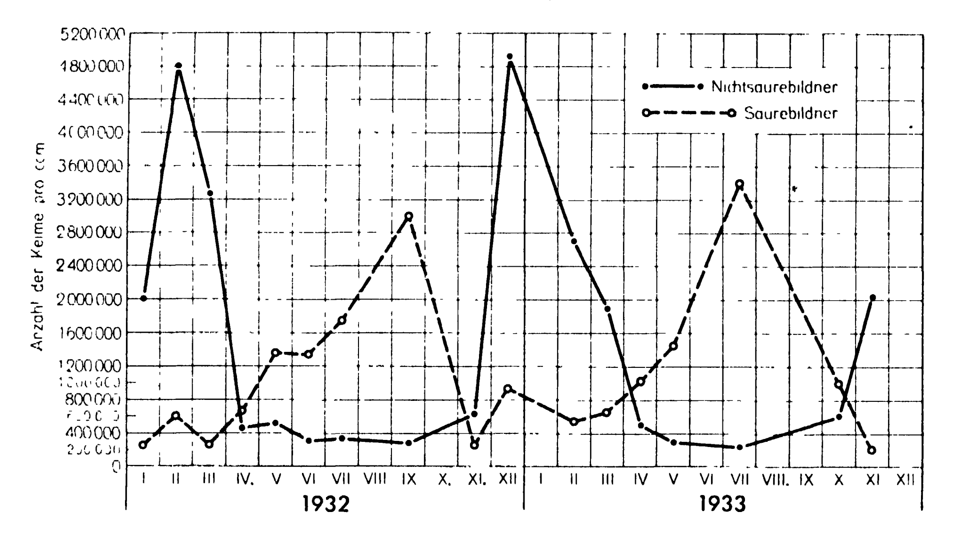


Abb. 1. Keimzahlung von Rohmilchproben.

Nach Literaturangaben (A. Wolff) wurden die nichtverflüssigenden Alkalibildner lange Zeit nicht beachtet und erkannt, „da diese Bakterien auf den ersten Blick indifferente Milchbewohner zu sein schienen“. Früher wurden sie öfters mit der Coli-aerogenes-Gruppe und den Kokken zusammen behandelt. Wolff beschreibt 4 Rassen, die sich jedoch auf Grund der Beschreibung nicht identifizieren lassen. Ayers und Rupp sahen alkalibildende Bakterien als solche an, die in 7 Tagen in Milch eine alkalische Reaktion hervorriefen. Weigmann bezeichnet die alkalibildenden Kurzstäbchen, die er in die Klasse der Katease-Bakterien stellt, als Erreger von Milchfehlern, Schädlinge in der Butterei, jedoch sehr nützlich in gewissen Stadien der Käsereifung. Henneberg beschreibt in seinem Lehrbuche kurz eine Gruppe von Bakterien, die er als Alkalibildner zusammenfaßt. Auch in kleineren Schriften weist Henneberg immer wieder auf die Wichtigkeit der Alkalibildner hin als Erreger von Milchfehlern verschiedenster Art und Schädlinge für die Molkereiprodukte. Das neueste Buch des gleichen Autors bringt in kurzer Beschreibung die einzelnen Gruppen der Alkalibildner.

A. 2. Isolierung, Reinzucht und Weiterzüchtung.

Zu den Untersuchungen wurde frisch angelieferte Milch verschiedener Lieferanten der Lehrmeierei der Preußischen Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft in Kiel verwendet. Die einzelnen Proben wurden in verschiedenen Verdünnungen in Chinablau-Milchzuckeragar-Röhrchen (Bitter)

bei 45° C eingeimpft, in sterile Petrischalen gegossen und im Thermostaten bei 30° C bebrütet. Nach 48 Std. Wachstum wurden durch kräftige Aufhellung der Platte sehr gut zu erkennende Alkalibildner-Kolonien unter dem Plattenmikroskop ausgewählt. Besondere Anreicherungsmethoden waren unnötig, da die Isolierung von den weniger dicht bewachsenen Platten keine Schwierigkeit bot. Die isolierten Stämme wurden durch Plattenpassagen geschickt, die der Sicherheit der absoluten Reinheit wegen vorgenommen wurden; die meisten Stämme waren jedoch, wie die Kontrolle ergab, schon als Reinkultur gewonnen. Isoliert wurden: Mikrokokken, Sarcinen, Streptokokken, Coryne- und Mycobakterien, nicht sporenbildende Alkalistäbchen und Sporenbildner. Unter den Nichtsporenbildnern waren Vertreter der Bacterium alcaligenes-Gruppe, Proteus- und Fluorescens-Gruppe

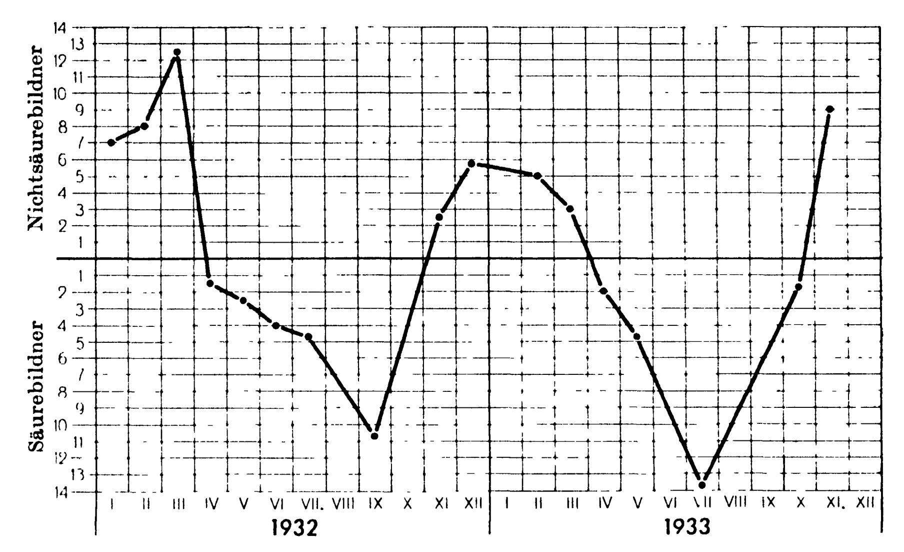


Abb. 2. Verhältniskurve der Nichtsäurebildner zu den Säurebildnern bei der Keimzahlung. Ordinate = jeweils 1 :

und das als Schleimbildner bekannte Bact. lactis viscosum; unter den Sporenbildnern Stämme der Bac. subtilis-, mesentericus-, mycoides- und megatherium-Gruppe.

Zur Weiterzüchtung wurde stets 3 proz. Bouillonagar von alkalischer Reaktion (p_H 7,4—7,6) mit 1% Milchzucker verwendet. Spätestens alle 4 Wochen, bei Bedarf noch eher, wurde auf frischen alkalischen Milchzuckeragar neu übergeimpft und nach je 3 Monaten in sterile Magermilch gebracht, um etwaig geschwächte Eigenschaften wieder zu stärken, d. h. die einzelnen Stämme in ihren Auswirkungen „virulent" zu erhalten. Dies gelang auch voll und ganz bis auf einen Stamm, der die Fähigkeit der Schleimbildung in Milch verlor, und auch nach etlichen Milchpassagen, auch solchen mit kleinen Milchzuckerzusätzen, nicht mehr wiedererlangte.

A. 3. Methoden der Untersuchungen.

Zur systematischen Untersuchung der einzelnen Stämme wurden folgende Methoden angewandt:

1. Alkalibildung: Nährboden: Chinablau-Milchzuckerbouillonagar (1 proz., p_H 7,4—7,6) (nach Bitter etwas geändert).

2. Studium der Zelle: Federstrichkulturen nach Henneberg in 1 proz. Milchzuckerbouillon.
3. Kartoffelscheiben: im Autoklaven fraktioniert sterilisiert.
4. Gramfärbung: etwas geändert, je 2 Min. mit Karbol-Gentianaviolett und Lugolscher Lösung gefärbt, mit abs. Alkohol entfärbt und mit verd. Karbolfuchsin 7 Sek. nachgefärbt.
5. Geißelfärbung: nach Gray.
6. Eiweißabbau: in fraktioniert sterilisierte weiße Magermilch, auf Wasseragar mit 33% Magermilch, im Gelatinestich und durch Bestimmung des Aminostickstoffes nach van Slyke.
7. Stärkeabbau: Bouillonagar mit 10% wasserlöslicher Stärke, Reagens: Lugolsche Lösung.
8. Fettspaltung: Mikromethode nach Henneberg.
9. Wachstum in Bouillon mit verschiedenen Salz-, Milchsäure- und Sodazusätzen. Salzzusatz: 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 12, 15%. Milchsäurezusatz: 0,1 0,2 0,3 0,4 0,5 0,7 1,0 1,2 1,5 2,0%. Sodazusatz: 0,5 1,0 2,0 3,0 5,0 7,0 10,0%.
10. Fäulnis, Ammoniak oder Aromastoffe: Leitungswasser mit 3% Pepton Witte.
11. Wachstum bei niederer Temperatur: im Käsekeller der Lehrmeierei der Anstalt (14° C).
12. Geschmacksveränderungen von Vollmilch: aseptisch gewonnene Milch kurz auf 80° C erhitzt — Zerstörung der bakteriziden Eigenschaft (Drewes) — auf 20° C abgekühlt und in sterile Kulturflaschen ohne Wattestopfen (zur Vermeidung des brandigen Geschmacks) gefüllt, beimpft und mit halben Petrischalen abgedeckt.
13. Reduktase: 20 ccm beimpfte Magermilch mit 1 ccm wässeriger Methylenblaulösung (1 Tablette Methylenblau Merck in 200 ccm aqua dest.).
14. Katalase: 15 ccm Milch mit 5 ccm 1 proz. Wasserstoffsuperoxydlösung 2 Std. bei Zimmertemperatur.
15. Indolbildung nach Frieber, Ehrlich und Kovacs.
16. Nitratreduktion: Zugabe von 0,5% KNO_3 (10%) zu gewöhnlicher Nährbouillon, Beimpfung und 6 Tage Bebrutung bei 30° C. Nachweis des Nitrits mit Sulfaninsäure nnd α-Naphthylamin.
17. Laufende Titrationen: titriert wurde jedesmal 20 ccm beimpfte Milch mit n/10 KOH, gegebenenfalls n/10 HCl. Indikator Phenolphthalein oder Orangerot. Die Kulturen wurden zunächst 2 Tage bei 30° C bebrütet, dann zur Vermeidung einer stärkeren Verdunstung bei 20° C gehalten. Die Klammern ( ) in den Tabellen zeigen an, daß hier n/10 HCl zur Neutralisation genommen werden mußte. Der Titer der unbeimpften Kontrollmilch ist in den Tabellen nicht berücksichtigt.
18. Vergleichende Untersuchungen: zuckerfreier Chinablau-Bouillonagar und solcher mit 2% Milchzuckerzusatz.
19. Pasteurisierungsversuche: nach der im Kieler Bakteriologischen Institut für praktische Zwecke gebräuchlichen Ampullenmethode (siehe dort).
20. Säuerung verschiedener Kohlehydrate u. dgl. und Reduktion des Lackmusfarbstoffes: 2% der verschiedenen Kohlehydrate u. dgl. zu zuckerfreier Bouillon. Indikator 7% Lackmus.

Die Bebrutung fand, wenn nicht anders vermerkt, stets bei 30° C statt.

B. Eigene Untersuchungen mit den aus Rohmilch isolierten alkalibildenden Organismen.

I. Mikrokokken und Sarcinen.

a) Morphologische Untersuchungen.

1. Die Kolonien der 6 isolierten Mikrokokken- (1—6) und 2 Sarcinenstämme (7 u. 8) waren makroskopisch alle klein bis mittelgroß und rund. St. 1, 2, 4, 5 und 6 morphologisch fast gleich, nur in der Farbbildung verschieden. Bei 100 facher Vergrößerung unter dem Plattenmikroskop: kugelig erhaben, undurchsichtig, von fein gekrümelter Struktur, Rand glatt. St. 3: 100/1: spitzkugelig, durchscheinend wie ein Wassertropfen, keine innere Zeichnung, Rand glatt, später fein granuliert und unregelmäßig fein gezähnt. Die beiden Sarcinenstämme (7 u. 8) 100/1: Kolonie undurchsichtig,

grob gekörnt, fast knollig, Rand glatt, später gezackt, die Sarcinenpakete erkennen lassend.

2. Die Zellen der Mikrokokken waren bei allen rund, nur bei den Sarcinen schienen sie zeitweise an einer Seite (zum Paket hin) etwas abgeplattet. Die Zellgröße war bei allen nur geringen Schwankungen unterworfen, Mikrokokken 0,6—0,8 μ ∅, Sarcinen: (7 u. 8) 0,8—1,2 μ ∅. Bei St. 1, 2, 6 lagen die Kokken einzeln und in kleinen festen Haufen, bei St. 3 u. 4 wurden nebenher kleinere Ketten bis 5 Glieder und Diploformen gebildet, bei St. 5 außerdem noch vereinzelt Tetraden. St. 7 u. 8 zeigten teils dicke Paketballen, teils unvollständige Pakete.

3. Der Belag auf Kartoffelscheiben war nach 4 Tagen mit Ausnahme von St. 3 gering. Nach 9 Tagen war die Auflage bei St. 1, 3, 6 üppig, saftig, fettglänzend, dick aufliegend. St. 1: kräftig gelb, St. 3: erst ziemlich trocken körnig, grau-gelbbraun, später graugelb wie feuchte Kreide, St. 6: gelb. St. 2, 4, 7 u. 8 zeigten kolonieartiges Wachstum. St. 2: kleine kugelige bräunliche Kolonien, St. 4: kleine kugelige feuchte violettbraune, St. 7: saftig blaßgelbe erhabene und St. 8: feucht gelbe stark erhabene Kolonien. Bei St. 5 zog sich ein grauvioletter Schleier über die Kartoffelscheibe.

Ein 2. Versuch mit Kartoffelscheiben zeitigte nicht genau dieselben Resultate. Es wurden Unterschiede in der Üppigkeit und auch im Feuchtigkeitsgrad des Wachstums festgestellt, so daß offenbar das Kartoffelmaterial mitbestimmend wirkte.

4. Bewegliche Mikrokokken und Sarcinen wurden nicht beobachtet.

5. Sämtliche Mikrokokken und Sarcinen waren grampositiv.

b) Physiologische Untersuchungen.

1. Die Beobachtungen in Bouillon erstreckten sich auf mehrere Tage Der Bodensatz — Färbung wie die Agarkolonie — war bei allen Mikrokokkenstämmen stark bis sehr stark, fest und zerteilte sich erst nach energischem Schütteln korkzieherartig nach oben. Die Trübung war bei St. 1, 3, 5 und 6 ziemlich stark, gleichmäßig; St. 2 und 4 trübten mäßig. Nur St. 3 bildete ein dünnes trockenes Häutchen, während St. 6 lediglich eine Ringbildung am Glasrand zeigte. Der sehr starke Bodensatz der beiden Sarcinenstämme, ebenfalls wie die Agarkolonien gefärbt, hatte eine lockere Beschaffenheit und löste sich beim Schütteln leicht, zuerst fädig, dann staubig auf und verteilte sich homogen. Trübung war nicht vorhanden.

2. Die Magermilch blieb bei allen Stämmen unverändert flüssig, mit Ausnahme des Sarcinenstammes 7, der sie durch Lab dicklegte. Das Koagulum löste sich später wieder. Der Kaseinabbau ging sehr langsam vor sich. St. 3 und 6 begannen am 9. bzw. am 14. Tag aufzuhellen und hatten die Milch nach 30 Tagen gänzlich peptonisiert. St. 1, 2, 4, 5 und 7 begannen am 28. Tag. Während St. 7 nach 45 Tagen, St. 1 und 5 nach 56 Tagen das Kasein restlos abgebaut hatten, hellten St. 2 und 4 nach 56 Tagen lediglich die obere Hälfte der Milch auf. St. 8 begann mit der Peptonisierung erst nach 7 Wochen, und hatte nach Abschluß der Versuche (8 Wochen) erst deutlich sichtbare Aufhellung im oberen Teile des Röhrchens hervorgerufen. Der Kaseinabbau begann stets an der Oberfläche, die Aufhellung schritt ununterbrochen nach unten fort. Drei Stämme (2, 4 und 5) machten die Milch bei 20° C (Zt.) z. T. außerordentlich schleimig. Die Fäden bei St. 2 ließen sich meterlang ausziehen, bei St. 5 bis zu 1,5 m, bei St. 4 nur 15—20 cm.

3. Vorweg sei erwähnt, daß die Milchagarplatten im Vergleich mit den Milchröhrchen den Vorteil des schnelleren Beginns der Aufhellung haben, demgegenüber jedoch den Nachteil, daß sie ein evtl. sich bildendes Koagulum durch Lab natürlich nicht anzeigen. Noch schnellere Aufhellung kann erzielt werden, wenn — wie Stolze bereits vorschlägt — an Stelle des Milchwasseragars — Milchbouillonagar verwendet wird. St. 7 hellte den Agar bereits nach 3 Tagen sichtbar auf und nach 14 Tagen vollständig. St. 3 und 6 begannen am 6. bzw. am 9. Tag und hatten nach 30 Tagen das Kasein abgebaut. St. 1, 2, 4 und 5 bauten nach 14 Tagen schon deutlich ab und hellten die Platte nach 56 Tagen vollständig auf, während St. 8 nach 4 Wochen begann und nach 8 Wochen stark abgebaut hatte.

4. St. 1, 2, 4, 5 nnd 8 zeigten in Gelatinestich keine Verflüssigung. St. 3 begann nach 7 Tagen, St. 6 und 7 nach 16 Tagen mit schalenförmiger Verflüssigung, die dann zylindrisch wurde. Nach 16 bzw. 45 Tagen waren die oberen Zweidrittel der Gelatine abgebaut. Eine weitere Verflüssigung fand nicht mehr statt. Das ist vielleicht so zu erklären, daß die Organismen streng aerob sind, und durch die überstehende abgebaute Flüssigkeit in ihrem Wachstum gehemmt wurden und dann zugrunde gingen.

Eine Gegenüberstellung des Eiweißabbaues in Milch oder auf Milchagar mit demjenigen der Gelatine zeigt bei den Mikrokokken und Sarcinen, wie auch bei allen übrigen untersuchten alkalibildenden Bakterien — wie weiter unten ersichtlich — einwandfrei, daß alle Alkalibildner, welche die Gelatine verflüssigten, auch die Milch peptonisieren, nicht aber umgekehrt; demnach ist Milch, bzw. Milchagar, ein viel günstigeres Erkennungsmittel für die Proteolyse als die Gelatine.

5. Sämtliche mit Mikrokokken und Sarcinen beimpften und gut angewachsenen Petrischalen zeigten mit Lugolscher Lösung übergossen intensive Blaufärbung; Stärke wurde also nicht verzuckert.

6. Die Vollmilch-Federstriche wurden längere Zeit beobachtet. Alle Mikrokokken- und Sarcinenstämme zeigten bis auf St. 6 keine Fettspaltung. Dieser hatte lediglich schwaches Spaltungsvermögen und ließ im mikroskopischen Bild aufgequollene Fettkügelchen erscheinen.

7. Bei der periodischen Prüfung der Kulturen in Milchzuckerbouillon bei 14° C zeigte es sich, daß das Wachstum etwas langsamer vor sich ging als bei 30° C. Nach 14 Tagen jedoch war bei allen Mikrokokken- und Sarcinenstämmen ein sehr starker Bodensatz vorhanden von derselben Konsistenz wie bei denen bei 30° C bebrüteten. St. 5 und 6 zeigten Trübung, während die Kulturen von St. 1—4 nur ganz schwach getrübt waren. Beide Sarcinenstämme ließen die Bouillon klar.

8. Die Milchkulturen bei niederer Temperatur zeigten große Unterschiede gegenüber denjenigen bei Bruttemperatur. St. 3, 6, 7 und 8 waren nicht imstande, die Milch aufzuhellen; bei den übrigen Stämmen war die Peptonisierung erst nach 35 Tagen makroskopisch sichtbar, und nur bei St. 1 nach 56 Tagen stark. Der Schleimigkeitsgrad war nicht stärker als bei 20° C, wie sonst häufiger gerade bei Kokken und Sarcinen gefunden wird. Auch sonst nicht schleimige Kulturen wiesen bei niederer Temperatur diese Fähigkeit nicht auf, wie es bei diesen Temperaturen oft der Fall ist.

9. Bei dem Studium des Wachstums der verschiedenen Bakterienarten in Bouillon mit verschiedenen Zusätzen interessierten die Salzzusätze für die Käserei — Salzen der Käse und Bildung der Schmiere —; die Milchsäurezusätze, um festzustellen, bei wieviel Prozent Milchsäure — als Stoffwechsel-

produkt der Milchsäurebakterien, mit denen die Alkalibildner stets in der Milch zusammenleben — letztere zugrunde gehen (siehe Tabelle).

10. Durch die Impfung der Organismen in Peptonwasser sollte durch den Geruch festgestellt werden, welche Stämme durch Spaltung des Peptons Fäulnis erzeugten, Ammoniak oder Aromastoffe bildeten. Die gut angewachsenen Kulturen wurden deshalb zur Prüfung in kleine, nicht zu hohe, saubere und geruchfreie Bechergläser entleert. Feststellung siehe Tabelle.

11. Die Prüfung der mit den einzelnen Bakterienstämmen beimpften aseptisch gewonnenen Milch ließ nach 24 Std. keine erkennbare Geschmacksveränderung hervortreten, so daß nach 48 Std. nochmals probiert wurde. Ergebnisse siehe Tabelle.

12. Prüfung auf Reduktase und Katalase: das Wesen der Reduktaseprobe und ihre Bedeutung für die Praxis behandelt Christiansen in der „Milchw. Zeitg." Lübeck 1926. Er schlägt in seiner Abhandlung vor, anstelle des bisher üblichen Methylenblaues — Janusgrün zu nehmen. Er begründet seinen Vorschlag mit der Nichtreoxydierbarkeit des Janusgrüns. Mehlhose und Demeter sehen keine Vorteile in der Benutzung des Farbstoffes Janusgrün, auch nicht in der Azurufinprobe von Kloz und kommen deshalb zu dem Schluß, daß weiterhin am zweckmäßigsten Methylenblau zu verwenden sei. Bei vorliegenden Versuchen wurden deshalb ebenfalls 20 ccm der mit den Reinkulturen frisch beimpften Milch mit 1 ccm wässeriger Methylenblau-Lösung im sterilen Reagenzglase gemischt. Die Rohrchen wurden mit einem sterilen Gummistopfen luftdicht abgeschlossen, um die Reoxydierung des weißen Methylenblaues (Leucobase) durch den Luftsauerstoff zu verhindern. In kurzen Zeitintervallen wurde die Reduktion beobachtet (siehe Tabelle). Versuche mit 6 Tage alten Milchkulturen, denen Methylenblau-Lösung zugesetzt wurde, zeigten selbst nach 48 Std. keine Reduktion. Die Wielandsche Theorie, daß Methylenblaureduktion eine Folge des Stoffwechsels der Organismen ist, dürfte hiermit eine weitere Stützung erfahren haben. Wurde es sich um ein Enzym „Reduktase" handeln, so müßte es auch nach 6 Tagen noch wirksam sein, während der Stoffwechsel nach dieser Zeit praktisch gleich Null ist. Die Katalaseproben wurden bei Zimmertemperatur 2 Std. stetig beobachtet und des öfteren durchgeschüttelt. Eine längere Beobachtungszeit als 2 Std. war unnötig, da keinerlei Veränderung mehr eintrat. Die z. T. bei den einzelnen Stämmen sehr variierenden Sauerstoffabscheidungen sind aus der Tabelle zu ersehen.

13. Während weder mit der Ehrlichschen Methode, noch nach Frieber oder Kovacs für irgendeinen Alkalibildnerstamm auch nur die geringste Spur von Indol nachgewiesen werden konnte, zeigten verschiedene Stämme z. T. recht starkes Nitratreduktionsvermögen (siehe Tabelle).

14. Wie bei allen Untersuchungen mit Bitterschem Chinablauagar wurde auch bei Prüfung der Alkalibildung der einzelnen Stämme durch die Stichkultur in frisch bereiteten und sterilisierten Milchzucker- und Traubenzucker-Chinablauagar die doppelte Menge der sonst üblichen gesättigten Chinablau-Lösung dem flüssigen Milch- und Traubenzuckeragar zugesetzt. Die einfache Menge genügt wohl zu der einwandfreien Diagnose auf Säurebildner; die sehr schwache Färbung ist jedoch weniger gut geeignet, um Alkalibildner festzustellen und kann leicht vor allem bei dünner Schicht in Platten zu Irrtümern führen.

Mikrokokken

Stamm	Farbe und Glanz der Kolonien	Chinablau-bouillon M.Z.-Agar Stich	Chinablau-bouillon T.Z.-Agar Stich	Milch Geschmack	Milch schleimig	Gelatine-Verflüssigung	Kaseinabbau Milch	Kaseinabbau Milchagar	Verzuckerung Stärkeagar
1	kräftig grünlichgelb, saftig	alk.	sauer	leicht bitter	—	—	+++	+++	—
2	rosabraun naß	schwach alk.	sauer	leicht bittersüß-mandel	+++	—	++	+++	—
3	schwach braungelb, feucht	alk.	sauer	süß, Erdbeer	—	++	+++	+++	—
4	blaß rosabraun, naß	alk.	sauer	leicht bitter	+	—	++	+++	—
5	violett-rosa feucht	alk.	sauer	leicht bitter	++	—	+++	+++	—
6	schwach zitronengelb, saftig	alk.	alk.	aromatisch süß	—	++	+++	+++	—
7	hellgelb, matt	alk.	sauer	mandelbitter	—	++	+++ Lab ++	+++	—
8	kräftig gelb, matt	schwach alk.	sauer	leicht bitter	—	—	+	++	—

M.Z.-Agar = Milchzuckeragar; T.Z.-Agar = Traubenzuckeragar; alk. = alkalisch;

Die Mikrokokken und Sarcinen hellten den Milchzucker-Chinablauagar stets von oben nach unten auf. St. 3, 4, 5 und 6 hatten schon nach 14 Tagen das obere Drittel, St. 1, 2, 7 und 8 das obere Viertel des Agars aufgehellt und nach weiteren 14 Tagen völlig, bis auf St. 2 und 8, die schwach alkalisierten. Der Traubenzucker-Chinablauagar wurde von allen Stämmen mit Ausnahme von St. 6 gesäuert. Die Säuerung ging stets von oben aus. Nur St. 3 hatte nach 2 Tagen schon den ganzen Agar blau gefärbt, während die anderen Traubenzucker säuernden Mikrokokken (St. 1, 2, 4, 5) 14 Tage dazu benötigten; die beiden Sarcinenstämme (St. 7 und 8) 28 Tage.

15. Von besonderem Interesse war die Feststellung, wie weit die Alkalibildner in der Lage sind, alkalische Reaktionen in der Milch hervorzurufen. Da sich, wie vorauszusehen, die Versuche über eine längere Zeit erstreckten und viele Titrationen nötig machten, wurden 500 ccm Kolben mit je 300 ccm Milch genommen, die 15 Titrationen zu je 20 ccm zuließen, Sterilisation wie üblich. Die Titrationen wurden so lange durchgeführt, bis 3 Titrationen dasselbe Resultat erbrachten, bzw. in einigen Ausnahmefällen die Milch verbraucht war. In diesen Fällen dürften jedoch kaum wesentlich andere Resultate wie in den Tabellen ersichtlich, auf die hiermit hingewiesen wird, zu erwarten sein.

Weder in Milchzucker- noch Traubenzucker- oder Milchagar-Schüttelkultur trat sichtbare Gasbildung auf.

In der Literatur finden sich eine Reihe von Angaben über alkalibildende Mikrokokken und Sarcinen, die das zahlreiche Auftreten in allen natürlichen Medien beweisen. Henneberg fand sie in großen Mengen in fehlerhafter Milch.

und Sarcinen.

Peptonwasser Fäulnis	Peptonwasser Ammoniak	Fettspaltung	Bildung von Indol	Bildung von Nitrit	Reduktase	Katalase	Wachstum bei niederer Temp. (Käsekeller 14° C) Bouillon	Wachstum bei niederer Temp. (Käsekeller 14° C) Milchpeptonisierung	Resistenz gegen Salz (Es wird noch vertragen) %	Resistenz gegen Milchsäure %	Resistenz gegen Soda %
++	++	—	—	—	2 Std.	25 Min. 5 ccm	+++	++	15	1,0	5,0
++	++	—	—	+++	7 Std.	2 Std. 3,5 ccm	+++	sehr stark schleimig +	15	0,5	5,0
+ aromatisch	—	—	—	+++	2¾ Std.	15 Min. 5 ccm	+++	—	15	1,2	5,0
—	+	—	—	+++	6½ Std.	2 Std. 2 ccm	+++	schleimig +	15	0,7	5,0
+++	+++	—	—	+++	6¼ Std.	2 Std. 2 ccm	+++	stark schleimig +	12	1,0	5,0
leicht aromatisch Akazienblüten	—	+	—	+	2 Std.	2 Std. 5 ccm	+++	—	15	1,0	5,0
stark aromatisch	—	—	—	—	6¼ Std.	2 Std. 4 ccm	+++	—	15	0,7	5,0
—	—	—	—	—	mehr als 10 Std.	2 Std. 0,2 ccm	+++	—	15	1,2	5,0

+ = mäßig; ++ = stark; +++ = sehr stark.

Laufende Titrationen der mit den Mikrokokken und Sarcinen beimpften Magermilch.

Stamm	2 Tage	4 Tage	7 Tage	10 Tage	14 Tage	19 Tage	23 Tage	29 Tage	39 Tage	47 Tage	55 Tage	69 Tage
1	3,4	3,4	3,1	2,2	1,8	1,2	1,0	0,6	0,6	0,6	—	—
2	3,4	3,4	3,0	2,0	2,0	1,2	1,0	0,8	0,8	0,8	—	—
3	3,3	2,6	2,4	2,3	2,2	2,0	1,0	0,3	0,3	0,3	—	—
4	3,2	3,2	2,8	2,8	2,4	1,2	0,2	(1,0)	(3,0)	(3,8)	(3,8)	(3,8)
5	3,5	3,5	3,3	2,8	2,6	1,8	1,2	0,4	0,4	0,4	—	—
6	3,5	2,7	2,1	1,4	1,2	0,8	0,8	0,6	0,4	(2,0)	(2,0)	(2,0)
7	3,5	3,5	3,4	3,0	2,6	2,4	1,8	1,0	0,6	0,6	0,6	—
8	3,5	3,5	2,9	2,4	1,7	1,2	1,0	0,8	0,8	0,8	—	—

Stolze isolierte sie aus Rohmilch, Butter, Kase, Kuheuter, Kuhmist und anderem Material, und fuhrte in Besonderem Untersuchungen aus uber ihre Pathogenität. Er kommt auf Grund dieser Untersuchungen zu einem erstaunlich hohen Prozentsatz von pathogenen. Gubitz beschreibt einige kaltellebende Arten. Becker fand Mikrokokken als Molkereischädlinge, die er aus Molkereigebrauchswasser isoliert hatte. Viele Autoren geben noch andere Fundorte an, die zu der Annahme berechtigen, daß Mikrokokken überall ihre Lebensbedingungen finden. Während die morphologischen und physiologischen Merkmale im allgemeinen ziemlich konstant sind, ist die Farbstoffbildung in stärkeren Grenzen leicht Variationen unterworfen.

Bei den eigenen Untersuchungen zeigten die Schleimbildner St. 2, 4, 5 starke Ähnlichkeit. Die Farbstoffbildung wies nur kleine Unterschiede auf. Sie scheinen dem Micrococcus aurantiacus Cohn sehr nahe zu stehen. Ihr Schleimbildungsvermögen erinnert sehr stark an Micrococcus amarificans Migula, obgleich Gelatineverflüssigung und

Labgerinnung fehlen. St. 1 und 6 zeigten nahe Verwandtschaft mit dem von Weigmann als Micrococcus luteus Zimmermann für die nicht verflüssigende Art und als Micrococcus luteus L. et N. für die verflüssigende Art beschriebenen Organismen, während St. 3 gewisse Identität mit dem Micrococcus badius aufwies. Die beiden Sarcinenstämme 7 und 8, die ebenfalls große Ähnlichkeit zeigten, stehen den von Lehmann und Neumann als Sarcina lutea und Sarcina flava bezeichneten Organismen nahe.

II. Streptokokken.

a) Morphologische Untersuchungen.

1. Isoliert wurden 4 Streptokokkenstämme (9—12). Das Aussehen der Kolonien bei allen 4 Stämmen war ziemlich gleich, alle leicht erhaben. 100/1: hell durchscheinend mit z. T. feiner, z. T. gröberer krümeliger Zeichnung. Die noch hellere Randzone ließ Streptokokkenketten erkennen.
2. Die Zellform aller Streptokokken war rund. Die Zellteilung bei den Ketten ging in einer Richtung vor sich. Die Zellgrößen schwankten zwischen 0,5 und 0,8 μ. Bei allen Stämmen lagen die Kokken z. T. einzeln oder zu zweit, z. T. wurden kürzere und längere Ketten bis 25 Glieder gebildet. Die kürzeren Ketten waren meist gerade, während die längeren gebogene und hin und wieder verschlungene Formen aufwiesen.
3. Der Belag auf den Kartoffelscheiben war bei allen 4 Stämmen üppig, grau-weiß, feucht z. T. saftig.
4. Bewegliche Zellen oder Ketten wurden nicht beobachtet.
5. Alle Streptokokken waren grampositiv.

b) Physiologische Untersuchungen.

1. Auf keiner Bouillonkultur bildete sich eine Haut oder ein Ring am Glase. Die anfängliche z. T. schwache Trübung wurde später diffus stark bis sehr stark. Der zuerst z. T. geringe, dann starke Bodensatz war bei allen 4 Stämmen kompakt und erhob sich nach starkem Schütteln fadenziehend-korkzieherartig.
2. St. 12 baute kein Kasein ab. Die Peptonisierung der Milch bei den anderen Stämmen ging erst spät und sehr langsam vor sich.
3. Bei den Milchagarplatten konnte wiederum für die abbauenden Stämme schnellere Aufhellung festgestellt werden. St. 12 ließ auch die Agarplatte bei gutem Wachstum unverändert.
4. Kein Streptokokkenstamm verflüssigte die Gelatine.
5. Stärke wurde nicht verzuckert.
6. Dagegen erwiesen sich die Streptokokken als sehr starke und ziemlich schnelle Fettspalter. Angefressene, unregelmäßige Hüllen waren in Massen im Präparat zu sehen. Fettsäurekristalle wurden nicht beobachtet.
7. Das Wachstum der Streptokokken bei niederer Temperatur in Bouillon war ebenso wie bei 30° C, nur langsamer.
8. Während der ganzen Beobachtungszeit (8 Wochen) vermochte kein Streptokokkenstamm Kasein abzubauen. Die Milch blieb in ihrem Aussehen unverändert und ebenso unverändert flüssig, bis auf St. 12, der die Milch leicht schleimig machte.
9. Salz und Soda konnten die Streptokokken im Vergleich zu den Mikrokokken und Sarcinen auffallend wenig vertragen, Milchsäure dagegen fast ebensoviel.

10. In Peptonwasser siehe Tabelle.

11. Auffallend war der sehr bittere, leicht seifige Geschmack, den St. 9 in der „aseptischen" Milch verursachte. Der leicht seifig-ranzige Geschmack könnte bei St. 9 wohl auf die Fettzersetzung zurückzuführen sein. Sonderbarerweise fehlte jedoch dieser ranzige Geschmack bei den anderen Stämmen, obwohl gerade diese nach den Vollmilch-Federstrichen bedeutend schneller das Fett spalteten (siehe Tabelle).

12. Prüfung auf Reduktase und Katalase siehe Tabelle.

13. Bei den Streptokokken trat weder Indol- noch Nitritbildung in der jeweiligen Nährbouillon auf.

14. Der Stich in Milch- und Traubenzucker-Chinablauagar zeigte bei allen Streptokokken alkalische Reaktion. Der Traubenzuckeragarstich war insofern bemerkenswert, weil St. 11 nach 2 Tagen den Traubenzuckeragar in der Mitte der Agarmasse durch Säurebildung bläute, während an der Oberfläche eine leichte Alkalibildung zu konstatieren war. Diese Blaufärbung war nach 5 Tagen jedoch wieder verschwunden, so daß das Röhrchen wieder genau dieselbe Färbung zeigte wie die Kontrolle. Nach 10 Tagen zeigte sich eine neue Aufhellung an der Oberfläche, die mit der Zeit nach unten fortschritt. Die sehr starke Alkalibildung aus der Eiweißspaltung hatte also die anfänglich gut sichtbare Säuerung des Traubenzuckers nicht nur neutralisiert, sondern diese sogar ganz verdrängt.

15. Laufende Titrationen der mit den Streptokokken beimpften Magermilch.

Stamm	2 Tage	4 Tage	7 Tage	10 Tage	14 Tage	19 Tage	23 Tage	29 Tage	39 Tage	47 Tage	55 Tage
9	3,3	2,6	1,9	1,6	1,0	0,8	0,4	0,2	0,2	0,2	—
10	3,4	3,0	2,8	1,8	1,2	0,8	0,6	0,4	0,3	0,3	0,3
11	3,4	3,3	3,1	2,8	1,8	0,8	0,5	0,3	0,3	0,3	—
12	3,1	2,1	0,9	0,8	0,8	0,6	0,6	0,6	—	—	—

Angaben über alkalibildende Streptokokken bringt die Literatur nur sehr spärlich. Henneberg beschreibt einige zur Gruppe des Bact. lactis viscosum Adametz gehörende Arten. Die Streptokokken eigener Untersuchung müssen vorerst in diese Gruppe gestellt werden, da bisher andere Gruppen nicht beschrieben wurden. Streptococcus liquefaciens kann wegen seiner Gelatineverflüssigung und Säurebildung nicht zum Vergleich herangezogen werden. Es ist jedoch durchaus möglich, daß schon viele Alkali-Streptokokken untersucht, jedoch nicht als solche, sondern als Staphylokokken oder Corynebakterien bezeichnet worden sind, wie auch Wirth die Schwierigkeit des Erkennens der Streptokokken ausdrücklich hervorhebt. Nach Heim könnte es sich bei vorliegenden Stämmen auch um Streptococcus lactis handeln, der das Säurebildungsvermögen verloren hat.

III. Coryne- und Mycobakterien.

a) Morphologische Untersuchungen.

Isoliert wurden 7 Stämme (13—19). Die beiden Gruppen Coryne- und Mycobakterien wurden zu einer zusammengefaßt, da es bekanntlich gerade unter den nichtpathogenen (Farbstoffbildnern) viele Rassen gibt, die Übergänge bilden zwischen den beiden Gruppen, und diese daher schwer zu trennen

Strepto-

Stamm	Farbe und Glanz der Kolonien	Chinablaubouillon		Milch		Gelatine-Verflüssigung	Abbau von		
		M.Z.-Agar Stich	T.Z.-Agar Stich	Geschmack	schleimig		Milch	Milchagar	Stärkeagar
9	grau-weißlich-gelb, perlmutterartig, leicht irisierend	alk.	schwach alk.	sehr bitter l. seifig-ranzig	—	—	+	++	—
10	grau-weißlich-gelb, perlmutterartig, leicht irisierend	alk.	schwach alk.	bitter	—	—	+	++	—
11	wie vor irisierend-opalisierend, fadenziehend	alk.	alk., Mitte sauer	leicht bitter	—	—	++	+++	—
12	wie vor irisierend-opalisierend, fadenziehend	alk.	alk.	widerlich bitter, faulig	+	—	—	—	—

sind. Ist auch an und für sich die „Säurefestigkeit“ bei den Mycobakterien ein Hauptunterscheidungsmerkmal gegenüber den „nichtsäurefesten“ Corynebakterien, so kann die Säurefestigkeit der Mycobakterien gerade bei den nichtpathogenen Farbstoffbildnern teils sehr gering, teils gar nicht vorhanden sein, unterscheiden sich also in dieser Beziehung gar nicht mehr von den Corynebakterien. Ebenso können sich die Merkmale der Kolonien: weich und locker (Corynebakt.) einerseits, und trocken und fest (Mycobakt.) andererseits verschieben und sich derart nähern, daß die betreffende Rasse weder mit unbedingter Bestimmtheit zu der einen noch zu der anderen Gruppe gestellt werden kann.

1. Die Kolonieform bei allen Stämmen war rund. St. 13: klein, 100/1: wasserhell durchscheinend, keine innere Zeichnung, kreisrund, gleichmäßiges Aussehen der Gesamtkolonie, Rand glatt. St. 18: sehr kompakt, mittelgroß, 100/1: undurchsichtig, trocken, knollig, gefalten wie eine Rosette, Randzone dünn, durchscheinend, gebuchtet und gelappt, fein gekörnt. Die Kolonien der anderen Stämme (14, 15, 16, 17 und 19) waren ebenfalls klein und kugelig. 100/1: Mitte undurchsichtig, fein gekörnt, Randzone dünn, durchscheinend, teils gebuchtet und gelappt oder gekerbt, teils glatt, sonst homogen.

2. Die Federstrichkulturen der Coryne- und Mycobakterien zeigten mehr oder weniger starke Lichtbrechung. Bei Zusammenballung von kleinen Grüppchen war an einem Ende meist keulenförmige bis kugelige Anschwellung zu beobachten, während das andere Ende der Zelle häufig mehr oder weniger spitz auslief (St. 13 und 16). Waren die Zellen meist zu zweit oder auch in kürzeren Ketten vereinigt, so waren sie selten keulenförmig aufgequollen, sondern in mehr oder weniger spitzem oder stumpfem Winkel aneinandergelagert. Die Größenabmessungen schwankten bei den einzelnen Stämmen in der Breite von 0,5—0,8 μ und in der Länge zwischen 1,2 und 2 μ.

3. Das Wachstum auf Kartoffelscheiben war mit Ausnahme der St. 13 und 16 üppig bis sehr üppig, dick aufliegend, z. T. saftig und glatt, z. T. trocken, knollig, körnig, krümelig, gefalten. Der Belag bei St. 13 und 16 blieb auch nach längerer Zeit dürftig, kolonieartig, kugelig, stecknadelkopfgroß.

kokken.

Peptonwasser		Fettspaltung	Bildung von		Reduktase	Katalase	Wachstum bei niederer Temp. (Käsekeller 14° C)		Resistenz gegen		
Fäulnis	Ammoniak		Indol	Nitrit			Bouillon	Milchpeptonisierung	Salz	Milchsäure	Soda
									Es wird noch vertragen		
									%	%	%
+++	—	+++	—	—	5½ Std.	30 Min. 5 ccm	+++	—	7	0,7	2
+	—	+++	—	—	5½ Std.	35 Min. 5 ccm	+++	—	7	1,0	3
—	—	+++	—	—	5 Std.	35 Min. 5 ccm	+++	—	10	0,7	2
+ champignonartig	—	+++	—	—	5 Std.	2 Std. 3 ccm	+++	— schwach schleimig	7	1,0	2

4. Alle Stämme waren unbeweglich, auch in jungen Kulturen.
5. Sämtliche Coryne- und Mycobakterien waren grampositiv.

b) Physiologische Untersuchungen.

1. Die St. 13, 14, 15 und 19 trübten anfänglich die Bouillon mäßig bis mittelstark. Die Trübung verschwand später. Bei den St. 16, 17 und 18 war die Bouillon stets klar. Der schon nach kurzer Zeit sehr starke Bodensatz war meistens locker, sandig, staubig und verteilte sich beim Schütteln leicht. Bei St. 17 und 18 war der Bodensatz klumpig bis sehr klumpig, die kleineren und größeren Klumpen hielten fest zusammen und lösten sich beim Schütteln nicht auf. Während sich auf der Bouillonoberfläche von St. 16 keine Haut ausbildete, blieb sie bei St. 13, 14, 15 ziemlich dünn und trocken und kletterte z. T. am Glase hoch. Die anfänglich dünne trockene Haut bei den St. 17, 18, 19 wurde schnell dicker, z. T. rissig, grobkörnig und kletterte ebenfalls am Glasrande hoch. St. 18 bildete einen 1 cm starken Pfropfen über der Bouillon. Das Wachstumsoptimum lag zwischen 20 und 30° C.

2. Die Magermilch blieb bei allen Stämmen unverändert flüssig. St. 13, 15, 16 und 19 bauten kein Kasein ab, St. 14 erst nach 56 Tagen sehr schwach. St. 17 und 18 peptonisierten die Milch anfangs sehr langsam und färbten sie später hellgelb.

3. St. 13, 15, 16, 19 hellten die Milchagarplatte bei sehr gutem Wachstum nicht auf. Bei St. 14, 17 und 18 verlief die Aufhellung sehr langsam.

4. Kein Coryne-Mycobakterienstamm verflüssigte die Gelatine.

5. Stärke wurde von keinem Stamm verzuckert.

6. Butterfett wurde in den Vollmilch-Federstrichen von St. 13, 15, 16 und 17 nicht gespalten, von St. 14 sehr schwach; bei St. 18 und 19 waren die Fettkügelchen leicht angefressen und auseinandergelaufen. Die Fettspaltung ging sehr langsam vor sich.

7. Das Wachstum bei niederer Temperatur in Milchzuckerbouillon war sehr gut. St. 13, 14 und 19 trübten die Bouillon dauernd stark, bei St. 15, 16, 17 und 18 blieb sie klar. Hautbildung und Bodensatz wie bei 1.

Coryne-

Stamm	Farbe und Glanz der Kolonien	Chinablau-bouillon M.Z.-Agar Stich	Chinablau-bouillon T.Z.-Agar Stich	Milch Geschmack	Milch schleimig	Gelatine-Verflüssigung	Abbau von Milch	Abbau von Milch-agar	Abbau von Stärke-agar
13	weißlich, saftig	schwach alk.	sauer	normal	—	—	—	—	—
14	orange, fettglänzend	alk.	alk.	leicht bittersuß	—	—	(+)	++	—
15	schmutzig weiß, später Stich ins Violette, naß	alk.	alk.	bitter, leicht seifig	—	—	—	—	—
16	zitronengelblich, matt	alk.	sauer	leicht bittersüß	—	—	—	—	—
17	orangegelb-hellbraun, matt, ziemlich trocken	alk.	alk.	leicht bittersüß	—	—	+++	+++	—
18	orangegelb-hellbraun, glanzlos, brüchig trocken	alk.	alk.	leicht bitter	—	—	+++	+++	—
19	schwach orange, matt, zieml. trocken	alk.	alk.	leicht bitter	—	—	—	—	—

8. Alle Stämme ließen die Magermilch bei niederer Temperatur gänzlich unverändert. Kein Stamm peptonisierte oder machte die Milch schleimig.

9. Salz vertrugen die Stämme teils 15, teils 12 bzw. 10%; Milchsäure 0,4—0,7%. Bei den Sodazusätzen schwankten die Prozentzahlen enorm (2—7%).

10. u. 11. Siehe Tabelle.

12. Die Reduktionszeiten bei der Reduktaseprobe waren auffallend lang; auch Katalase war nur in geringen Mengen vorhanden. Einzelheiten siehe Tabelle.

13. Kein Coryne- und Mycobakterienstamm bildete Indol und mit Ausnahme von St. 16 auch keiner Nitrit.

14. St. 13 hellte im Milchzucker-Chinablauagarstich den Agar nur langsam und schwach auf, während der Traubenzuckeragar langsam gesäuert wurde. Alle anderen Stämme (14—19) hellten den Milchzuckeragar auf, wie sie auch den Traubenzucker-Chinablauagar alkalisierten mit Ausnahme von St. 16. Die Aufhellung war ziemlich schnell und vollständig, bei Traubenzucker etwas langsamer. St. 16 säuerte den Traubenzucker außerordentlich schnell und stark.

15. Hand in Hand mit den Beobachtungen an den Chinablauagarstichen gingen die laufenden Titrationen der Milchkulturen. St. 13, der im Milchzucker-Chinablauagarstich nur langsam aufhellte, bildete auch in der Milch nachweisbar erst am 7. Tage Alkali und verbrauchte analog der schwachen Alkaleszenz im Agarstich auch in der Milch nach 55 Tagen noch 1,2 ccm n/10 KOH zur Neutralisation gegen Phenolphthalein, während die übrigen Stämme auch in der Milch schneller und besser Alkali bildeten (siehe Tabelle).

In der Literatur sind nur sehr wenige Angaben über farbstoffbildende Coryne- und Mycobakterien zu finden. Diese Organismen wurden erst sehr spät als solche er-

Mycobakterien.

Peptonwasser		Fettspaltung	Bildung von		Reduktase	Katalase	Wachstum bei niederer Temp. (Käsekeller 14° C)		Resistenz gegen — Es wird noch vertragen		
Fäulnis	Ammoniak		Indol	Nitrit			Bouillon	Milchpeptonisierung	Salz %	Milchsäure %	Soda %
—	—	—	—	—	7 Std.	2 Std. 2 ccm	+++	—	15	0,4	3
+ aromatisch	—	(+)	—	—	7 Std.	2 Std. 2,4 ccm	+++	—	15	0,7	3
++	+	—	—	—	7 Std.	2 Std. 1,7 ccm	+++	—	12	0,7	3
+ l. aromatisch	—	—	—	+++	8 Std.	2 Std. 2,2 ccm	+++	—	15	0,7	7
+ l. aromatisch	—	—	—	—	10 Std.	2 Std. 0,4 ccm	+++	—	12	0,7	3
+	—	+	—	—	mehr als 10 Std.	2 Std. 0,7 ccm	+++	—	10	0,5	2
++	—	+	—	—	6½ Std.	2 Std. 1,5 ccm	+++	—	15	0,7	3

kannt; früher wurden sie z. T. unter die Bacteriaceen eingereiht. Die einzige zusammenhängende und ausfuhrliche Arbeit ist die von Kißkalt und Berend, der auch die bakteriologische Diagnostik von Lehmann und Neumann folgt. Der Hauptunterschied der einzelnen Rassen wird durch die verschiedene Farbstoffbildung gekennzeichnet.

Laufende Titrationen der mit den Coryne- und Mycobakterien beimpften Magermilch.

Stamm	2 Tage	4 Tage	7 Tage	10 Tage	14 Tage	19 Tage	23 Tage	29 Tage	39 Tage	47 Tage	55 Tage
13	3,5	3,5	3,4	3,2	2,8	2,5	2,0	1,5	1,3	1,3	1,3
14	3,4	3,1	2,8	2,2	2,0	1,6	1,0	0,7	0,7	0,7	—
15	3,2	2,4	1,4	1,0	0,6	0,4	0,4	0,3	0,3	0,3	—
16	3,2	2,5	1,6	1,1	0,8	0,6	0,5	0,3	0,3	0,3	—
17	3,0	2,3	1,2	0,9	0,7	0,5	0,2	0,2	0,2	—	—
18	3,0	2,3	1,3	1,0	0,9	0,8	0,6	0,2	0,2	0,2	—
19	3,2	2,4	1,1	0,8	0,5	0,2	(0,1)	(0,1)	(0,1)	—	—

St. 14 und 19 ähneln nach den Beschreibungen von Kißkalt sehr dem Corynebacterium flavum α psychrophilum. Gleichartig ist die Nichtverflüssigung der Gelatine, der Bodensatz und auch die Häutchenbeschaffenheit, ebenso die feine Form der Stäbchen, Unbeweglichkeit und positive Gramfärbung. Wenn St. 19 auch in verschiedenen Dingen nicht ganz mit St. 14 übereinstimmt, so dürfte er doch nahe verwandt sein. St. 13 und 15 sind nicht in die von Kißkalt beschriebenen Rassen einzureihen, da kein einziger weißer Stamm angeführt ist. St. 13 hat eine gewisse Ähnlichkeit mit dem von Henneberg in seiner Alkalibildnerarbeit unter den Corynebakterien beschriebenen Stamm f; St. 16 stimmt nur in der Farbe mit dem von Kißkalt aus der Luft isolierten

und von ihm Corynebacterium helvolum benannten Organismus überein. Physiologisch ist keine Eigenschaft gemeinsam, auch nicht mit den von Henneberg beschriebenen beiden gelblichen Stämmen a und b. Die Kolonien der St. 17 und 18 sind so trocken, fest und kompakt, daß sie nur den Mycobakterien nahestehen können. St. 18 hat große Ähnlichkeit mit dem von Lehmann und Neumann als Modifikation des Mycobacterium lacticola beschriebenen tuberkelähnlichen Butterbacillus Rabinowitsch. St. 17 hat ebenfalls gewisse Eigenschaften mit diesem Bazillus gemein, scheint jedoch eher zwischen ihm und dem gleichfalls von Lehmann und Neumann als Modifikation des Mycobacterium lacticola beschriebenen Stamm Tobler II zu stehen, mit dem er ebenfalls gemeinsame Eigenschaften aufweist, nur daß die Farbstoffbildung schneller ausgeprägt und die Agarkultur noch trockener ist. Auf Grund der wenigen Arbeiten, die sich mit Coryne- und Mycobakterien beschäftigen, ist es naturgemäß sehr schwer, irgendwelche Arten unterzubringen; vor allem auch dadurch, daß die einzelnen Rassen nicht genau beschrieben und lediglich nach ihrer Farbstoffbildung benannt worden sind. Farbstoffbildende Coryne- und Mycobakterien finden sich jedoch fast in jeder Rohmilch, sehr häufig im Wasser und auch in der Luft, so daß diese Gruppe einer ausgedehnten Bearbeitung bedarf.

IV. Alkalibildende Stäbchen (Nichtsporenbildner).

Von dieser Gruppe wurden 10 Stämme isoliert, und zwar Vertreter von den Untergruppen: Bact. alcaligenes, Bact. fluorescens, Bact. vulgare und Bact. lactis viscosum. Bevor die eigenen Untersuchungen hier wiedergegeben werden, sollen jeweils die sehr zahlreichen, sich häufig widersprechenden und oft recht unklaren Literaturangaben der einzelnen Untergruppen kurz besprochen werden.

Bacterium-alcaligenes-Gruppe.

Das Bact. alcaligenes, auf Grund heutiger Kenntnis als eine Gruppe bezeichnet, wurde zuerst von Petruschky aus verdorbenem Bier isoliert, charakterisiert und Bac. faecalis alcaligenes genannt. Migula und auch Matzuschita folgen in ihren Handbüchern der Beschreibung Petruschkys. Berghaus bestätigt im allgemeinen die Angaben Petruschkys, nur die Begeißelung gibt er als lophotrich an. Klimenko teilt auf Grund eingehender Untersuchungen die Gruppe des Bac. faecalis alcaligenes in 2 Untergruppen ein, und verwirft die Berghaussche Theorie.

Baerthlein beschreibt aus menschlichem Stuhl isolierte Stämme des Bac. faecalis alcaligenes als größtenteils gerade, nur z. T. schwach gekrümmte Stäbchen. Pollak glaubt die Formverschiedenheit nach seinen Untersuchungen nur auf die Verschiedenheit des Nährbodens zurückführen zu müssen.

Lehmann und Neumann bezeichnen in der 7. Auflage ihrer bakteriologischen Diagnostik eigenartigerweise das Bact. alcaligenes L. et N. ihrer früheren Auflagen als Vibrio alcaligenes. Sie stützen sich dabei auf Untersuchungen von Jos. Strecker, der 30 Stämme untersuchte. Auf Grund welcher Tatsachen Lehmann und Neumann jedoch nun plötzlich umbenennen, dürfte, wie auch Henneberg in seiner Alkalibildner-Arbeit bereits unterstreicht, nicht ganz klar und gerechtfertigt erscheinen. Denn Strecker gibt selbst an, daß Bact. alcaligenes lediglich in jungen Kulturen häufig leicht gekrümmt ist, ohne jedoch aufklären zu können: warum die verschiedenen Formen in den verschiedenen Stadien auftraten. Ebenso findet sich in fast keiner Literaturangabe der Vermerk eines Vibrionentypus.

Die alte Bezeichnung dürfte demnach vorweg bemerkt, wie auch eigene Untersuchungen ergaben, die richtigere sein. Die Bezeichnung „Vibrio“

dürfte jedenfalls verfrüht und erst dann angebracht sein, wenn auf Grund weiterer Arbeiten einwandfrei erwiesen ist, daß es neben den geraden Formen auch konstant gekrümmte gibt, so daß es sich also um 2 Rassen handelt, die als Bact. alcaligenes und als Vibrio alcaligenes zu bezeichnen wären.

a) Morphologische Untersuchungen.

1. Von der Gruppe Bact. alcaligenes wurden 3 Stämme (20, 24 und 25) isoliert. Die Kolonieform war bei allen klein, die Auflage flach. 100/l: gelblich durchscheinend, ohne jegliche Zeichnung mit gleichmäßigem Aussehen der Gesamtkolonie. Der Rand war anfangs glatt, später erscheint die Randzone z. T. abgeschnürt, z. T. fein gezackt.

2. Die Abmessungen waren 0,4—0,5 μ zu 0,7—1 2 μ. Die Stäbchen hatten eine stark schlängelnd-schießende Bewegung, z. T. wurden kurze Ketten bis 5 Glieder gebildet; zu zweit zusammenhängende Zellen wurden oft beobachtet. Die Stäbchen waren stets gerade mit abgerundeten Ecken, Vibrionenformen wurden nicht beobachtet. Ebenso wurden bei einer früher angefertigten unveröffentlichten Untersuchung bei 8 isolierten Alkaligenesstämmen ebenfalls nur Stäbchen, nie Vibrionenformen festgestellt.

3. Das Wachstum auf Kartoffelscheiben war kräftig, glänzend, graubraun. St. 25 hatte die ganze Kartoffel grau-bräunlich verfärbt.

4. Bei St. 20 und 24 wurden nie mehr als 3 endständige Geißeln beobachtet. St. 25 hatte bis 7 Geißeln, ebenfalls endständig, oft bipolar oder auch zopfartig verflochten. Wo 2 Zellen zusammenstießen, ragte seitlich ein Geißelbüschel heraus.

5. Alle 3 Stämme waren gramnegativ.

b) Physiologische Untersuchungen.

1. Das Wachstum in Milchzuckerbouillon war kräftig. Die Bouillon wurde von allen Stämmen stark getrübt. Der Bodensatz löste sich beim Schütteln fädig-schleimig nach oben. St. 20 bildete keine Haut, St. 24, 25 eine dünne trockene.

2. u. 3. Magermilch und Milchagar wurden von St. 20 und 25 nicht aufgehellt. St. 24 peptonisierte die Magermilch vollständig ohne vorherige Labgerinnung. Die Flüssigkeit war gelb-braun verfärbt und durchsichtig. Die Milchagarplatte wurde schon nach kurzer Zeit vollständig aufgehellt.

4. St. 20 und 25 verflüssigten auch keine Gelatine, während St. 24 mit schalenförmiger Verflüssigung begann, die schnell zylindrisch wurde. Verflüssigt wurde selbst nach 56 Tagen lediglich die obere Hälfte.

5. Kein Stamm besaß Diastase.

6. Fett wurde im Vollmilch-Federstrich nur von St. 24 gespalten. Die Fettkügelchen hatten zu Anfang runde Konglomerate gebildet, die dann unregelmäßig wurden und nach kurzer Zeit kleine „Fraßbetten“ erkennen ließen.

7. u. 8. Bei niederer Temperatur wuchsen die Alkaligenesstämme sehr gut. St. 20 blieb im Gegensatz zur Bruttemperatur klar und wies wie auch St. 25 in der Bouillon lediglich Ringbildung am Glasrand auf. Der Bodensatz war gleich kräftig und von fädig-schleimiger Konsistenz. St. 20 und 25 peptonisierten auch bei 14° C die Magermilch nicht. St. 25 ließ jedoch bei dieser Temperatur die Milch leicht schleimig werden, was bei Bruttemperatur

nicht der Fall war. St. 24 hellte die Milch auch bei 14° C vollständig, jedoch langsam auf und verursachte ein sehr starkes Schleimigwerden.

9. Sehr hohe Salzkonzentrationen wurden von keinem der 3 Stämme vertragen, gegen Milchsäure zeigten sie sich nicht besonders empfindlich, während sie Soda verhältnismäßig wenig vertrugen.

10. u. 11. Siehe Tabelle.

12. Die Reduktionszeiten der einzelnen Stämme waren für die Methylenblau-Milch sehr unterschiedlich, und ebenso ergaben sich bei der Katalaseprobe große Differenzen. St. 25 besaß gar keine Katalase; während die Sauerstoffabspaltung bei St. 24 praktisch ebenfalls gleich Null war, war sie bei St. 20 sehr bedeutend.

13. Kein Stamm vermochte weder Indol noch mit Ausnahme von St. 25 Nitrit zu bilden.

14. Im Chinablau-Milchzucker- und -Traubenzuckeragar ging die Aufhellung bei St. 20 schnell und gleichmäßig vor sich, während sich bei St. 24 und 25 die Farbstoffreduktion langsamer vollzog.

15. Ein analoges Bild zeigten auch wieder die laufenden Titrationen der mit den drei Stämmen beimpften Magermilch.

Laufende Titrationen der mit den „Alcaligenes" beimpften Magermilch.

Stamm	2 Tage	4 Tage	7 Tage	10 Tage	14 Tage	19 Tage	23 Tage	29 Tage	39 Tage	47 Tage	55 Tage	69 Tage
20	3,1	2,7	2,4	2,2	2,0	1,2	0,6	0,4	0,3	0,3	0,3	—
24	3,5	3,3	3,0	2,8	2,2	1,9	1,4	1,1	0,8	0,5	0,5	0,5
25	3,4	3,3	3,2	3,0	2,6	2,0	1,4	1,2	0,8	0,4	0,4	0,4

Vorstehende Angaben, die von den Beschreibungen Klimenkos nur wenig abweichen, dürften auch bestätigen, daß es sich bei der Gruppe des Bact. alcaligenes um ein Stäbchen und nicht um ein Vibrio handelt. Da ferner weder nach den Literaturangaben, noch nach eigenen Untersuchungen jemals ein unbewegliches Bact. alcaligenes gefunden wurde, sind die Angaben von Weigmann und Wolff und ebenso von Becker, die in ihren Beschreibungen Vertreter des Bact. alcaligenes als unbeweglich bezeichnen, sehr zu beachten.

Bacterium fluorescens-Gruppe.

Bei der Durchsicht der Literatur über diese Gruppe zeigt es sich, daß in den älteren Lehrbüchern, Matzuschita, Weigmann u. a., Bact. fluorescens als eine verflüssigende, fluoreszierende Bakterie bezeichnen, die mit Bact. pyocyaneum identisch und polar begeißelt ist, während Bact. putidum eine nicht verflüssigende Abart darstellt, und Bact. punctatum ebenfalls polar begeißelt, dem Bact. fluorescens nahesteht. Pribram und Pulay versuchten die Unterschiede zwischen Bact. fluorescens und Bact. putidum, da eine Unterscheidung auf morphologischem und physiologischem Wege nicht möglich wäre, auf Grund serologischer Studien festzustellen. Burckhardt glaubte in der Begeißelung Unterschiede zu finden. Lehmann und Neumann halten Fluoreszens und Putidum, abgesehen von der Gelatineverflüssigung, für kaum verschieden. Lantzsch vertritt auf Grund seiner Versuche die Ansicht, daß eine Trennung nicht möglich ist, da sich

überall Übergänge in der Gruppe nachweisen lassen. Lieske glaubt ebenfalls nach eingehenden Studien Bact. pyocyaneum, Bact. fluorescens, Bact. putidum und Bact. punctatum zu einer großen Gruppe vereinigen zu müssen, in der die vier verschiedenen Stämme keine „Bakterienarten", sondern lediglich „abweichende Formen" darstellen. Hüttig untersuchte 582 Stämme verflüssigender und nicht-verflüssigender Bakterien der Bact. fluorescens-Gruppe, und kommt durch die Nachprüfung einer Reihe „milchwirtschaftlich wichtiger Eigenschaften" zu der Überzeugung, daß mindestens zwei gut unterscheidbare Arten vorliegen.

a) Morphologische Untersuchungen.

1. Bei den eigenen Untersuchungen wurden 3 Stämme der Bact. fluorescens-Gruppe isoliert (St. 27, 28 und 34). Kein Stamm bildete Fluorescein. Die Kolonien waren mittelgroß und leicht erhaben. 100/1: Die Mitte der Kolonien war undurchsichtig, gekörnt, die Randzone heller, durchscheinend, z. T. rund, z. T. gebuchtet, gelappt und zerfranst.

2. Die Kurzstäbchen waren stark beweglich, die Bewegung schlängelnd-schießend, oft zu zweit oder kleine Ketten bis zu 4 Gliedern bildend. Die Größe war etwas verschieden: 0,5—0,8 μ breit und 1,2—2,0 μ lang. Fadenbildung wurde nirgends beobachtet, ebenfalls keine gekrümmten Stäbchen.

3. Das Wachstum auf Kartoffeln war gut. Der anfänglich wenig erhabene, gelbliche, saftige Belag wurde bald ziemlich üppig.

4. Die Begeißelung war endständig; es wurden bis zu 5 polare Geißeln gezählt. Bipolare Begeißelung wurde nicht beobachtet.

5. Alle 3 Stämme waren gramnegativ.

b) Physiologische Untersuchungen.

1. Die Milchzuckerbouillon wurde von allen 3 Stämmen bei dünner Häutchenbildung gleichmäßig stark getrübt. Der feste Bodensatz stieg nach kräftigem Umschütteln fädig-korkzieherartig nach oben.

2. und 3. Die Magermilch wurde ziemlich schnell abgebaut. St. 28 und 34 koagulierten die Milch zunächst schwach, verflüssigten sie jedoch bald wieder. Auf Milchagar ging die Aufhellung noch rascher vor sich, schon nach 48 Std. waren die Platten sehr stark aufgehellt.

4. Die Gelatine wurde ebenfalls schnell verflüssigt. Die anfangs schalenförmige Verflüssigung wurde bald zylindrisch, und war bei St. 27 vollständig, während bei St. 28 und 34 das untere Drittel der Gelatine auch nach 56 Tagen fest blieb.

5. Diastase besaßen St. 27 und 34 sehr stark bzw. stark, St. 28 eigenartigerweise nicht. Es ist möglich, daß St. 28 das Stärkeverzuckerungsvermögen verloren hatte, da der Versuch erst sehr spät mit oftmals übergeimpften Kulturen ausgeführt wurde.

6. Fett spalteten alle 3 Stämme. St. 27 zeigte bereits nach 48 Std. deutliche „Fraßstellen" an den zusammengelaufenen Fettkugeln; bei St. 28 und 34 waren angefressene Fettkügelchen deutlich sichtbar ohne vorhergehende Konglomeratbildung.

7. Bei niederer Temperatur blieb die Bouillon bei St. 27 und 28 klar, nur St. 34 trübte leicht. Auch fehlte bei St. 27 die Hautbildung. Der Bodensatz war von gleicher Konsistenz wie bei 30° C.

8. Der Kaseinabbau in Magermilch setzte bei 14° C erst ziemlich spät

ein und war auch in seinem ganzen Verlaufe langsamer. Eine Labfällung oder ein Schleimigwerden trat nicht ein.

9. Die Fluoreszenten waren gegen Salz ziemlich empfindlich, während sie Milchsäure verhältnismäßig gut vertrugen. Die Widerstandsfähigkeit gegen Soda war sehr gering.

10. und 11. Siehe Tabelle.

12. Das Reduktionsvermögen von Methylenblau war ziemlich stark, die Katalase außerordentlich wirksam.

13. Während von keinem Stamm Indol gebildet wurde, reduzierte nur St. 27 das Nitrat.

14. St. 27 und 28 hellten den Milchzucker-Chinablauagar ziemlich schnell und gleichmäßig von oben nach unten auf. St. 34 dagegen verursachte zunächst von oben her Alkaleszenz und säuerte von unten, die Säuerung wurde neutralisiert, so daß nach 30 Tagen eine gleichmäßig schwache Aufhellung im ganzen Röhrchen stattgefunden hatte. Der Traubenzucker-Chinablauagar wurde von allen 3 Stämmen schnell gesäuert. Die intensive Blaufärbung wich nach 15 Tagen bei St. 27 und 28 einer Alkalibildung von oben, die langsam nach unten fortschritt. St. 34 alkalisierte den einmal gesäuerten Traubenzucker-Chinablauagar nicht.

15. Die laufenden Titrationen brachten wieder das analoge Bild.

Laufende Titrationen der mit den „Fluoreszenten" beimpften Magermilch.

Stamm	2 Tage	4 Tage	7 Tage	10 Tage	14 Tage	19 Tage	23 Tage	29 Tage	39 Tage	47 Tage	55 Tage	69 Tage
27	3,2	2,9	2,5	2,2	2,0	1,8	1,4	0,6	0,2	(0,4)	(0,8)	(0,8)
28	3,5	3,3	3,2	2,8	2,5	2,0	1,8	1,5	1,5	1,5	—	—
34	3,7	3,5	3,2	2,8	2,5	2,0	1,5	1,5	1,5	—	—	—

Da die Ergebnisse dieser Versuche ziemlich genau mit denen von Hüttig für Bact. fluorescens (Flügge) L. et N. angegebenen physiologischen Eigenschaften übereinstimmen, kann es sich bei den untersuchten Stämmen, trotz des Fehlens von Fluorescein, doch nur um Bact. fluorescens handeln, das die Fähigkeit, diesen Farbstoff zu bilden, verloren hat. Die Angaben von Lehmann und Neumann: Milch nie koaguliert, schwache Indolessigsäurebildung, kein H_2S, konnten bei den untersuchten Stämmen nicht bestätigt werden.

Bacterium vulgare-Gruppe.

Über diese Gruppe liegen eine ganze Reihe Literaturangaben vor. Sie sind in der Hauptsache von Zeiß in einem großen kritischen Sammelreferat zusammengefaßt worden. Lieske bezeichnet Bact. vulgare als ein in seiner Größe sehr variables Stäbchen, das „allgemein bei der Proteinfäulnis auftritt". Weigmann sowie Lehmann und Neumann stellen Bact. vulgare mit Bact. Zopfii zu der Proteus-Gruppe zusammen. Weigmann weist ferner neben dem Kaseinabbau auf die Fettspaltung hin. Henneberg hat Vertreter der Proteus-Gruppe als Käsereischädlinge in der Harzkäsefabrik und auch des öfteren in fehlerhafter Milch gefunden. Matzuschita beschreibt in seiner bakteriologischen Diagnostik den Bac. proteus vulgaris (Bact. vulgare) als ein pathogenes Stäbchen.

Diese Angabe der Pathogenität ist durch die sehr häufige Beobachtung von Proteus bei bakteriellen Nahrungsmittelvergiftungen (Fleisch, Wurst, Fisch) in der Folgezeit des öfteren einwandfrei erwiesen und bestätigt worden. Demnitz hat sowohl im Patientenstuhl als auch in der verdorbenen Wurstprobe Bact. proteus nachweisen können.

a) Morphologische Untersuchungen.

Von der Proteus-Gruppe wurden 3 Vertreter isoliert (St. 21, 22 und 23). Die Kolonien waren zart, dünn aufliegend und rund; später verbreiterten sie sich und bildeten unregelmäßige Ausläufer. 100/1: zunächst rund, gelblich durchscheinend mit glattem Rand und feiner Körnelung. Die Randzone wurde schnell unregelmäßig breit, fast durchsichtig, gebuchtet, groß gelappt und zerfranst.

2. In der Federstrichkultur waren die 0,4—0,5 μ breiten Stäbchen von sehr verschiedener Größe. Es wurden Längen von 0,7—2,5 μ gemessen. Kürzere Ketten bis 5 Glieder wurden öfters beobachtet. Gekrümmte oder spiralig gewundene Formen konnten nicht festgestellt werden. Die Beweglichkeit war außerordentlich stark.

3. Das Wachstum auf Kartoffelscheiben war bei St. 23 gering und blieb auch nach ziemlicher Ausbreitung flach. Der schmale, aber ziemlich üppige Strich bei St. 21 und 22 war matt glänzend.

4. Bei St. 21 und 22 waren die Stäbchen von sehr vielen langen, peritrichen Geißeln besetzt, während die Geißelfärbung von St. 23 nie mehr als 6—10 peritriche Geißeln zeigte.

5. Während St. 21 und 22 nur gramnegative Stäbchen aufwies, wurden bei St. 23 auch vereinzelt grampositive beobachtet.

b) Physiologische Untersuchungen.

1. In Milchzuckerbouillon trat schon nach kurzer Zeit Trübung ein. Das Wachstum war schnell, am besten bei Zimmertemperatur. Der starke Bodensatz löste sich beim Schütteln leicht und verteilte sich gleichmäßig in der Flüssigkeit.

2. Die Magermilch wurde außerordentlich rasch peptonisiert, die Milch verfärbte sich braun; nur St. 23 koagulierte zunächst die Milch und begann mit dem Kaseinabbau verhältnismäßig spät, das Koagulum löste sich wieder mit fortschreitender Peptonisierung.

3. Die Milchagarplatte hatten die St. 21 und 22 schon nach 24 Std. stark aufgehellt, während St. 23 die Aufhellung erst nach 48 Std. sichtbar werden ließ.

4. Im Gelatinestich verflüssigten St. 21 und 22 die Gelatine schon nach 24 Std. schalenförmig. Die Verflüssigung, die schnell trichter- und schlauchförmig, dann zylindrisch wurde, war schon nach kurzer Zeit vollkommen eingetreten. Der Eiweißabbau bei St. 23 schritt in denselben Phasen langsamer fort.

5. Stärke wurde von St. 21 und 22 sehr stark, von St. 23 schwach verzuckert.

6. Die Vollmilch-Federstriche zeigten nach 48 Std. bereits große unregelmäßige Konglomerate von Fett mit deutlicher Korrosion. Am stärksten und schnellsten spaltete St. 22, St. 23 am wenigsten.

7. Bei 14° C war die Entwicklung in der Bouillon langsamer und geringer als bei Zimmertemperatur und 30° C.

Alkalibildende

Stamm	Farbe und Glanz der Kolonien	Chinablau-bouillon M.Z.-Agar Stich	Chinablau-bouillon T.Z.-Agar Stich	Milch Geschmack	Milch schleimig	Geißeln	Gelatine-Verflüssigung	Abbau von Milch	Abbau von Milchagar	Abbau von Stärkeagar
20	grau-gelblich-agarfarben, matt	alk.	alk.	stark bittersüß, faulig	—	polar 2—3	—	—	—	—
24	grünlich-gelb ziegenlederartig matt	alk.	alk.	leicht bitter	+++	polar 2—3	++	+++	+++	—
25	grau-gelblich-agarfarben, matt	alk.	alk.	unrein, süßlich, n. Kuhstall	+	polar 2—7	—	—	—	—
27	kein Fluorescein, weißlich-grau, ziemlich matt	alk.	sauer, später alk.	leicht bitter, süßlich	—	polar 2—4	+++	+++	+++	+++
28	kein Fluorescein, weißlich-grau, ziemlich matt	schwach alk.	sauer, später alk.	bitter	—	polar 2—5	++	+++ Lab ++	+++	—
34	kein Fluorescein, grau-grun, fettglänzend	schwach alk., unt. sauer	sauer	leicht bitter	—	polar 2—5	++	+++ Lab ++	+++	—
21	grau, dünn, matt	alk., unten sauer	sauer, später alk.	bitter, leicht faul	—	peritr. sehr viele	+++	+++	+++	+++
22	grau, dunn, matt	alk., unten sauer	sauer, später alk.	bitter, leicht faul	—	peritr. sehr viele	+++	+++	+++	+++
23	grau, dünn, matt	alk.	sauer	leicht bitter	—	peritr. 6—10	++	+++ Lab ++	+++	+
30	grau-gelb-bräunlich, fettglänzend	alk.	sauer später alk.	fade	zu Anfang ++	—	—	—	—	—

8. Der Kaseinabbau bei 14° C war bei St. 21 am stärksten. Bei St. 22 und 23 ging der Abbau langsamer bzw. sehr langsam vor sich.

9. Während die Widerstandsfähigkeit gegen Salz groß war, wurde Milchsäure, vor allem von St. 23 nur wenig vertragen; die Resistenz gegen Soda war ebenfalls gering.

10. u. 11. Siehe Tabelle.

12. Die Reduktionszeiten waren ziemlich kurz. Alle 3 Stämme besaßen im hohen Maße Katalase.

13. Kein Stamm bildete Indol. Das Nitratreduktionsvermögen war sehr stark.

14. St. 23 hellte den Milchzucker-Chinablauagar bald und schnell auf. Auffällig war das Verhalten der St. 21 und 22. Sie bildeten von der Oberfläche des Agars aus Alkali, während am Grunde des Röhrchens eine schwache Säurung eintrat. Nach 15 Tagen wurde keine Blaufärbung mehr beobachtet, der Agar hellte sich sehr stark auf. Traubenzucker wurde von allen 3 Proteusstämmen stark und schnell gesäuert. St. 21 und 22 jedoch neutralisierten bald die Säuerung und hellten den Agar vollkommen auf. Der sehr

Stäbchen.

Peptonwasser		Fettspaltung	Bildung von		Reduktase	Katalase	Wachstum bei niederer Temp. (Käsekeller 14° C)		Resistenz gegen (Es wird noch vertragen)		
Fäulnis	Ammoniak		Indol	Nitrit			Bouillon	Milchpeptonisierung	Salz %	Milchsäure %	Soda %
+++	++	—	—	—	1 Std.	10 Min. 5,0 ccm	+++	—	12	0,7	2
+	+	++	—	—	3¼ Std.	2 Std. 0,2 ccm	+++	+++ stark schleimig	7	0,5	2
+	—	—	—	+++	5½ Std.	2 Std. —	+++	— leicht schleimig	10	0,7	2
+ aromatisch	—	++	—	+++	2¼ Std.	5 Min. 5 ccm	+	+++	5	0,7	1
+	—	++	—	—	1½ Std.	10 Min. 5 ccm	++	+++	4	0,5	2
+	+	—	—	—	2 Std.	45 Min. 5 ccm	+++	+++	4	0,5	2
++	++	+++	—	+++	2 Std.	5 Min. 5 ccm	++	+++	15	0,5	2
++	++	+++	—	+++	2¾ Std.	15 Min. 5 ccm	+	+++	15	0,5	2
+	—	+	—	+++	2¾ Std.	2 Std. 0,8 ccm	+	+	15	0,3	2
++	—	+	—	—	4½ Std.	2 Std. 1,8 ccm	+++	—	4	0,5	1

säureempfindliche St. 23 dagegen war offenbar durch die von ihm selbst erzeugte Säure zugrunde gegangen, so daß eine Aufhellung unterblieb.

15. In der Magermilch ergab sich analog den Stichen für St. 23 sofort eine schwache Alkalescenz, St. 21 und 22 dagegen säuerten zu Anfang die Milch sehr schwach.

Laufende Titrationen der mit den „Proteusstämmen" beimpften Magermilch.

Stamm	2 Tage	4 Tage	7 Tage	10 Tage	14 Tage	19 Tage	23 Tage	29 Tage	39 Tage	47 Tage	55 Tage	69 Tage
21	3,7	3,4	3,3	3,2	3.0	2,6	2,0	1,8	1,4	(1,0)	(2,0)	(2,0)
22	3,8	3,5	3,4	3,0	2,8	2,5	2,0	1,5	1,2	(2,0)	(2,8)	(2,8)
23	3,4	3,2	3,0	2,7	2,2	1,8	1,2	1,0	0,6	0,6	0,6	—
Bact. lactis vicosum.												
30	3,4	3,2	2,6	2,4	2,0	1,7	1,2	0,8	0,2	(0,4)	(0,8)	(0,8)

Die Angabe verschiedener Autoren, daß aus Traubenzucker reichlich Gas gebildet wird, konnte durch die Traubenzuckeragar-Schüttelkultur

nicht bestätigt werden. Die Verschiedenheit der Labfällung der einzelnen Stämme, wie auch die schwache Säuerung von Milchzucker wird auch von anderen Autoren erwähnt. Daß bei St. 23 lediglich 6—10 peretriche Geißeln festgestellt werden konnten, kann durch die Färbetechnik verursacht worden sein.

Die hohe Salzfestigkeit und Kältetoleranz, sowie auch das starke Kaseinabbauvermögen macht diese Gruppe zu Käsereischädlingen. Durch das Auftreten von Bact. vulgare bei Vergiftungserscheinungen sowohl bei einzelnen Personen als auch bei Massenvergiftungen zu fast jeder Zeit, ist der Proteus-Gruppe vermehrte Aufmerksamkeit zu schenken. Bact. vulgare, das keinesfalls zur Euterflora der gesunden Kühe gehört und auch wohl kaum je im kranken Kuheuter zu finden ist, kann also lediglich auf sekundärem Wege in die Milch gelangen.

Bacterium lactis viscosum-Gruppe.

Bact. lactis viscosum, zuerst von Adametz als Erreger der schleimigen Milch nachgewiesen, wurde von ihm Bacillus lactis viscosus genannt. Er glaubte, daß der Bazillus aus verunreinigtem Wasser in die Milch gelangte. Weigmann und Gruber isolierten einen Bazillus aus schleimiger Milch, ohne ihn zu identifizieren; da sie gleichzeitig Bact. lactis viscosum aus einem mit Jauche verunreinigten Brunnen isolierten, gingen sie in ihrer Annahme, dieses Bakterium als Erreger des Schleimigwerdens der Milch anzusprechen, kaum fehl. Weigmann gibt in seiner Pilzkunde der Milch als Fundorte vor allem Oberflächenwasser, Teiche, Bäche usw. an. Henneberg stellte die Gruppe des Bact. lactis viscosum mit ihren wichtigsten morphologischen und physiologischen Eigenschaften zusammen.

a) Morphologische Untersuchungen.

Von dieser Gruppe konnte aus vielen Milchproben nur ein Stamm (St. 30) isoliert werden. Auf der Agarplatte wuchs Viscosum in kleinen, runden, halbkugeligen Kolonien. 100/1: gelb-bräunlich, durchscheinend, von ganz feiner krümeliger Struktur. Die scharf abgegrenzte wasserhelle Randzone war dünn, fast durchsichtig, mit welligem gekerbtem Rand. Die unbeweglichen Kurzstäbchen waren z. T. plump, gedrungen, z. T. fast Kokken oder sackartig und schlauchförmig aufgequollen (Involutionsformen), 0,5—0,7 μ zu 0,6—1,5 μ. Der Belag auf Kartoffelscheiben war von grau-weißer Farbe, feuchtem Glanz, ziemlich üppig. Nach Gram gefärbt wiesen sie nur eine schwache Färbung auf.

b) Physiologische Untersuchungen.

Das Wachstum in Bouillon war schnell mit sehr starker Trübung. Auf der Flüssigkeitsoberfläche bildete sich ein dünnes feines Häutchen, das schon vom kleinsten Stoß zerstört wurde. Der starke Bodensatz verteilte sich bei geringem Schütteln fädig-staubig. Bei 14° C war das Wachstum langsamer, die Trübung nicht ganz so stark. Ein proteolytisches Enzym konnte in Magermilch bei 30° und 14° C, auf Milchagarplatten und in Gelatine nicht festgestellt werden; auch Stärke wurde nicht verzuckert, Milchfett nur schwach korrodiert. Gegen Salz, Milchsäure und Soda war die Empfindlichkeit groß. Peptonwasser, Reduktase, Katalase, Geschmacks-, Indol- und Nitritbildungsvermögen siehe Tabelle. Die Alkalisierung des Milchzucker-Chinablauagars ging nur langsam vonstatten; Traubenzucker wurde sehr schnell und intensiv gesäuert, erst nach 15 Tagen trat Alkalibildung von oben her ein, die langsam vollendet wurde. Dasselbe Bild wie

der Milchzucker-Chinablauagarstich ergab die laufende Titration (siehe Tabelle der Titrationen mit den Proteusstämmen).

Die Vielgestaltigkeit der Kurzstäbchen — die leicht an eine Verunreinigung der Kultur glauben läßt — die auffallend geringe Widerstandsfähigkeit gegen Salz und Soda sind die Hauptmerkmale für Bact. lactis viscosum. Das Schleimbildungsvermögen von Viscosum war zu Anfang außerordentlich stark, ging jedoch bald verloren und konnte auch durch mehrere Passagen in verschiedenen Nährmedien nicht wieder angezüchtet werden. Wenn auch die Gruppe des Bact. lactis viscosum durch ihre langsame Alkalibildung der Milch und Butter, als auch dem Käse wenig schaden kann, auch Pathogenität nie festgestellt wurde, so ist doch die starke Schleimbildung sehr störend, so daß die Milch unter Umständen unbrauchbar, die Entrahmung des Butterfettes sehr schwierig und mangelhaft, sowie die Auslabung der Käsemilch unvollständig werden kann.

V. Alkalibildende Sporenbildner.

Obwohl sich die Sporenbildner in der Rohmilch durch die starke Konkurrenz der Milchsäurebakterien im allgemeinen nicht sehr stark vermehren, so müssen sie doch hier kurz abgehandelt werden, da sie in pasteurisierter und gekochter Milch bei günstigen Bedingungen und Temperaturen durch Süßgerinnung und vor allem außerordentlich starkem Eiweißabbau- und Fettspaltungsvermögen Schäden hervorrufen können. Die geschmacklichen Eigenschaften der Milch werden durch die Sporenbildner derart schnell verändert, daß sie zu menschlichem Genuß untauglich wird. Die Veränderung kann so weit gehen, daß vor einem Genuß gewarnt werden muß, denn durch bestimmte Sporenbildner infizierte Milch gilt allgemein als gefährlich für Säuglinge.

Da die Diagnostik bei den Sporenbildnern durch die außerordentlich starke Variabilität sehr erschwert wird — wie alle Autoren, die sich hiermit näher beschäftigt haben, bestätigen — so sollen zunächst die gemeinsamen physiologischen Eigenschaften zusammengefaßt, und dann die morphologischen Merkmale und Verschiedenheiten in den einzelnen Gruppen beschrieben werden.

Isoliert wurden 11 Stämme. Allen Stämmen war die schnelle Peptonisierung der Magermilch, die außerordentlich rasche (48 Std.) vollkommene Aufhellung der Milchagarplatten, sowie die starke Verflüssigung der Gelatine gemeinsam. Fett wurde von allen untersuchten Sporenbildnern, mit einer Ausnahme (29), mehr oder weniger stark und schnell angegriffen; ebenso säuerten alle Stämme Traubenzucker, abgesehen von St. 31. Schleimbildung trat bei keiner Kultur, weder bei 30° C noch bei Zimmertemperatur, noch bei 14° C auf. Der Eiweißabbau in Magermilch ging bei 14° C etwas langsamer vor sich als bei Bruttemperatur; St. 33 und 37 peptonisierten bei 14° C nicht. Stärke wurde mit Ausnahme von St. 26, 31, 36 und 37 verzuckert. Indol wurde in Trypsinbouillon nie gebildet; ebensowenig Gas aus Zucker. Nitratreduktionsvermögen besaßen fast alle Stämme, nicht St. 26, 31 und 36.

Die isolierten Stämme wurden in 4 Gruppen eingeteilt und zwar 1. Bac. mycoides, 2. Bac. megatherium, 3. Bac. mesentericus, 4. Bac. vulgatus. Bei der Einteilung wurden die Angaben von Henneberg, Lehmann und Neumann, Weigmann, Matzu-

Alkalibildende

Stamm	Farbe und Glanz der Kolonien	Chinablau-bouillon M.Z.-Agar Stich	Chinablau-bouillon T.Z.-Agar Stich	Milch Geschmack	Milch schleimig	Geißeln	Gelatine-Verflüssigung	Abbau von Milch	Abbau von Milchagar	Abbau von Stärkeagar
32	schmutzig-grau, ziemlich trocken	alk., unt. sauer	sauer	bitter	—	ohne	+++	+++	+++	++
33	schwach grau-braun, matt	alk. (schwach) unt. sauer	sauer	leicht bitter	—	peritrich	++	+++ Lab ++	+++	+++
38	schmutzig grauweiß, matt	alk., unten sauer	sauer	ekelhaft, total unrein und faul	—	ohne	+++	+++	+++	++
39	schwach graubraun, matt	alk., unten sauer	sauer	wie 38	—	ohne	+++	+++	+++	++
40	schmutzig grauweiß, matt	alk., unten sauer	sauer	wie 38	—	ohne	+++	+++	+++	++
29	grau-bräunlich, feucht	alk., unten sauer	schwach alk., Mitte u. unt. sauer	bitter	—	peritrich	+++	+++	+++	+++
31	grau-weißlich, feucht	alk.	alk.	stark bitter, faulig	—	peritrich	++	+++	+++	—
35	wie 31 fadenziehend	alk., unten sauer	alk., Mitte u. unt. sauer	bitter, faulig	—	peritrich	+++	+++	+++	++
36	grau-gelblich, fadenziehend	alk.	sauer	bitter, faulig	—	peritrich	+++	+++	+++	—
26	grau-gelblich, feucht	alk., unt. sauer	sauer	sehr bitter	—	peritrich	+++	+++ Lab ++	+++	—
37	wie 26	alk.	sauer	bitter	—	peritrich	++	+++ Lab ++	+++	—

schita, Migula, Perlberger, Holzmüller und Vogeler zu Hilfe genommen.

In der Gruppe 1 waren die St. 32 und 33 annähernd typische Mycoides. Das Aussehen der Agarkolonie von St. 32 war identisch mit dem von Holzmüller beschriebenen Bac. mycoides *α*, St. 33 mit Bac. mycoides *γ* Holzmüller. Die Abmessungen der grampositiven Stäbchen in Milchzuckerbouillon waren für St. 32: 0,9—1 μ zu 2—4 μ, St. 33: 0,6—0,7 μ zu 1,2—2,6 μ. St. 32 war unbeweglich und bildete lange Ketten. Bei St. 33 konnten nur bis zu 6 Geißeln nachgewiesen werden. Perlberger fand ebenfalls von 5 typischen Mycoidesstämmen 3 bewegliche und 2 unbewegliche.

Die Bouillon blieb klar, auf der Oberfläche bildete sich eine trockene krause Haut; der Bodensatz war locker. Vom Stichkanal gingen feinste z. T. stark verfilzte Härchen in die Gelatine. Die schalenförmige Verflüssigung schritt schnell zylindrisch fort. Der Belag auf Kartoffeln war bei St. 33 graubraun und etwas schleimig, bei St. 32 gering, schmutzig grau, ziemlich trocken. Während im Milchzucker-Chinablauagarstich von oben Alkali gebildet wurde,

Sporenbildner.

Peptonwasser		Fettspaltung	Bildung von		Reduktase	Katalase	Wachstum bei niederer Temp. (Käsekeller 14° C)		Resistenz gegen		
									Salz	Milchsäure	Soda
									Es wird noch vertragen		
Fäulnis	Ammoniak		Indol	Nitrit			Bouillon	Milchpeptonisierung	%	%	%
++	—	+++	—	+++	1 Std.	2 Std. 3,8 ccm	+++	+++	10	0,7	3,0
+	—	++	—	+++	4¼ Std.	45 Min. 5 ccm	+++	—	15	0,7	2
+++	+++	+++	—	+++	1 Std.	2 Std. 3,6 ccm	+++	+++	15	0,7	2
+++	+++	+++	—	+++	¾ Std.	2 Std. 3,2 ccm	+++	+++	15	0,7	2
+++	+++	+++	—	+++	1 Std.	2 Std. 3,2 ccm	+++	+++	15	0,7	2
+ aromatisch	—	—	—	++	2¼ Std.	10 Min. 5 ccm	++	+++	15	0,7	1
+++	++	++	—	—	5½ Std.	45 Min. 5 ccm	+++	+++	10	0,7	3
++	—	++	—	+++	2¾ Std.	5 Min. 5 ccm	+++	+++	15	0,7	1
++	—	+++	—	—	1½ Std.	10 Min. 5 ccm	++	+++	15	0,7	2
++	—	++	—	—	2¼ Std.	45 Min. 5 ccm	+	++	15	0,5	3
+	—	+	—	+++	5 Std.	2 Std. 2,4 ccm	++	—	15	0,2	1

säuerten beide Stämme von unten. Die Säuerung wurde wieder neutralisiert, so daß nach 30 Tagen gleichmäßig schwache Alkalescenz zu beobachten war. Ebenso wurde die Milch zu Anfang leicht gesäuert und nur langsam im geringen Maße Alkali gebildet (siehe Tabelle).

Die Gruppe 2 umfaßte 3 Vertreter der Bac. megatherium-Gruppe (St. 38, 39, 40), die alle nicht typisch waren und einen Übergang zur Mesentericus- und Subtilis-Gruppe bildeten. Das Zentrum der Kolonien war bei 100/1 undurchsichtig, gekörnt; die große Randzone durchscheinend, stark zerfranst, mit unregelmäßig gewundenen und gelockten, wurzelähnlichen Ausläufern. Die unbeweglichen, plumpen, stark granulierten Stäbchen von 1—1,2 μ Breite und 1,5—3 μ Länge bildeten in Bouillon z. T. lange verworrene Ketten. Alle Zellen waren nach Gram gut färbbar. Über die Kartoffelscheiben zog sich ein dünner, matt glänzender, grau-weißer Belag, der nach einigen Tagen ein schmutzig hefiges Aussehen annahm. Die Verflüssigung der Gelatine begann schalenförmig, wurde bald trichterförmig und endete zylindrisch. Bouillon wurde anfangs leicht getrübt, blieb später

aber klar mit Ringbildung am Glase. Der sehr starke Bodensatz verteilte sich beim Schütteln leicht. Im Milchzucker-Chinablauagarstich wurde zunächst das Chinablau von oben reduziert bei gleichzeitiger Säuerung von unten. Die Blaufärbung wich bald einer gleichmäßigen, sehr starken Aufhellung. Traubenzucker-Chinablauagar wurde sehr stark gesäuert. Analog verliefen die Titrationen der Magermilchkulturen (siehe Tabelle).

In die dritte Gruppe wurden 4 Stämme eingereiht (29, 31, 35 und 36). Typisch für Mesentericus war das Koloniewachstum nur bei St. 36, bei St. 29, 31 und 35 erinnerte es an Subtilis, während die Gelatineverflüssigung gerade bei St. 36 atypisch war und von schalenförmiger Verflüssigung schnell zu zylindrischer überging. St. 29, 31 und 35 verflüssigten typisch schalen-, dann trichterförmig und später zylindrisch. Beim Öffnen der Petrischalen war ein stechender Geruch (Mäusegeruch) deutlich wahrnehmbar. Die Kartoffelkulturen hatten einen üppigen und nur wenig feuchten, matt glänzenden Belag, der bald unregelmäßige Fältelung zeigte, von grau-weißer bis graugelblicher Färbung. Die lebhaft beweglichen schlanken Stäbchen waren 0,5—0,7 μ breit und 1,5—2,5 μ lang, z. T. wurden kleine Ketten, häufig Doppelzellen beobachtet. St. 31 war gramnegativ. Die Bouillon wurde von St. 29 und 35 nicht getrübt, von St. 31 und 36 nur zu Anfang. Alle 4 Stämme bildeten Häutchen auf der Bouillon-Oberfläche. Der nicht sehr starke Bodensatz war fädig, lose und verteilte sich beim Schütteln homogen. Milchzucker wurde von St. 31 und 36 nicht angegriffen. St. 29 und 35 bläuten den Agar von unten und hellten ihn von oben auf. Die Alkalibildung neutralisierte bald die Säure. Traubenzucker-Chinablau-Agarstich siehe Tabelle. Die stärkste Alkaleszenz in Milch wies St. 35 auf, die schwächste St. 36 (s. Tab.).

Laufende Titrationen der mit den Sporenbildnern beimpften Magermilch.

Stamm	2 Tage	4 Tage	7 Tage	10 Tage	14 Tage	19 Tage	23 Tage	29 Tage	39 Tage	47 Tage	55 Tage	69 Tage
32	3,8	3,9	3,6	3,0	2,5	2,0	1,8	1,7	1,5	1,5	1,5	—
33	3,6	3,8	3,5	3,1	3,0	2,8	2,0	2,0	2,0	—	—	—
38	4,2	4,5	5,0	5,8	5,2	4,2	2,8	1,8	0,6	(1,6)	(1,8)	(2,0)
39	4,7	5,0	5,6	6,0	5,6	3,8	3,2	1,6	0,4	(1,8)	(2,0)	(2,0)
40	4,4	4,8	5,4	6,2	6,0	4,0	2,2	1,8	0,5	(1,8)	(1,8)	(1,8)
29	3,8	3,6	3,0	2,6	2,4	1,8	1,0	1,0	1,0	—	—	—
31*	3,2	2,8	2,3	2,0	1,8	1,5	1,0	0,6	0,4	0,4	0,4	—
35	3,8	4,1	3,5	3,2	2,8	2,3	2,0	1,0	0,6	(1,4)	(1,4)	(1,4)
36	3,4	3,0	2,8	2,6	2,2	2,0	1,7	1,6	1,6	1,6	—	—
26	3,8	3,5	3,3	3,3	3,0	2,6	1,8	1,0	0,8	0,8	0,8	—
37	3,3	3,0	2,6	2,4	1,9	1,8	1,5	0,9	0,6	0,6	0,6	—

Die Gruppe 4 vereinigte die beiden Stämme 26 und 37. Während St. 37 ein typischer Vertreter der Bac. vulgatus-Gruppe war, erinnerte die Agarkolonie von St. 26 stark an Mesentericus. Die Gelatineverflüssigung war jedoch wieder typisch für Vulgatus, schalenförmig und später zylindrisch. St. 26 überzog fast die ganze Kartoffel mit einem üppigen, gelblichen, saftigen Belag; bei St. 37 war die feuchte gebliche Auflagerung knollig gefalten (typische Form). Das mikroskopische Bild im Federstrich von St. 26 hatte ebenfalls große Ähnlichkeit mit Mesentericus, 0,5 zu 0,8—1,2 μ, oft Doppelzellen; St. 37 erinnerte durch seine plumpen Stäbchen an Subtilis, 1,0 zu

1,2—1,5 μ, z. T. lange Ketten. St. 26 war grampositiv mit vereinzelt negativen Zellen und St. 37 zum größten Teil negativ. Die Begeißelung war peretrich. In Bouillon trat bei beiden Stämmen eine leichte Trübung auf, außerdem bildete sich ein dünnes, festes Häutchen. Der wenig starke Bodensatz erhob sich beim Umschütteln fädig-korkzieherartig und verteilte sich dann gleichmäßig. Milchzucker wurde im Chinablau-Agarstich zu Anfang von St. 26 von unten gesäuert, die Blaufärbung verschwand jedoch schon nach 5 Tagen, St. 37 hellte sofort den Milchzuckeragar auf (s. Tab.).

Alles weitere ist aus der großen Sporenbildner-Tabelle zu ersehen.

C. Versuche mit einigen ausgewählten charakteristischen Stämmen der einzelnen Gruppen.

Zu einigen Versuchen wurde eine Auswahl von Stämmen dahingehend getroffen, daß von jeder Gruppe möglichst der typischste Vertreter herangezogen wurde oder aber sonst solche, die besonders interessierten.

1. Vergleichende Versuche auf zuckerfreiem Chinablau-Bouillonagar und Milchzuckerbouillon-Chinablauagar.

Bei diesen vergleichenden Untersuchungen sollte festgestellt werden, ob ein Zusatz von Milchzucker das Wachstum beeinflußt und ob auch noch andere Faktoren beeinflußt werden. Die zu untersuchenden Stämme wurden mittels Drigalski-Spatel auf die verschiedenen Agarplatten ausgestrichen. Schon nach 24stünd. Bebrütung zeigten die Platten mit Milchzuckerzusatz im Vergleich zu den zuckerfreien ein bedeutend besseres Wachstum. Nach 3 Tagen war der Unterschied am deutlichsten. Nicht nur das Wachstum war günstig beeinflußt, sondern auch die Alkalibildung schneller sichtbar, außerdem die Farbstoffbildung bei den Farbstoffbildnern entschieden intensiver ausgeprägt. Bei Zuckergegenwart werden also auch die N-haltigen Stoffe der Bouillon schneller zersetzt.

2. Pasteurisierungsversuche.

Bei diesen Versuchen war es von Interesse, welche alkalibildenden Bakterien die Pasteurisierung überstehen und somit evtl. als Erreger von Milchfehlern bei pasteurisierter Milch und Milchprodukten aus dieser in Frage kommen. Das Hauptinteresse nahmen die Nichtsporenbildner ein. Ausgewählt wurden deshalb 8 Nichtsporenbildner und 4 Sporenbildner. Von den Nichtsporenbildnern Vertreter jeder Gruppe.

Die Pasteurisierung wurde vorgenommen nach der im Kieler Bakteriologischen Institut für praktische Zwecke gebräuchlichen Ampullenmethode, die sehr genau und sorgfältig arbeitet. Je 2 sterile, 5 ccm fassende, sehr dünnwandige Ampullen wurden mit 2—3 ccm der 16 Std. vorher mit den zu untersuchenden Organismen beimpften Milch beschickt und in einem Wasserbade ½ Std. bei 63° C gehalten. Das Wasserbad wurde möglichst groß gewählt, das Wasser häufig umgerührt, um in allen Teilen gleichmäßige Temperatur zu haben. Eine Abkühlung von oben her wurde durch Auflegen eines dickeren Tuches vermieden. Die Ampullen wurden an einem Galgen lose befestigt und in die Mitte des Wasserbades hineingehängt. Der Temperaturausgleich zwischen dem umgebenden Wasser und der Milch in den Ampullen war in 55 Sek. hergestellt. Nach der Pasteurisierungszeit wurden die Ampullen so-

fort unter der Wasserleitung abgekühlt. Von der pasteurisierten Milch wurden jeweils einige Tropfen auf Milchzucker-Agarplatten mittels Drigalski-Spatel ausgestrichen. Nach 48stünd. Bebrütung bei 30° C zeigte sich auf den Nichtsporenbildner-Platten kein Wachstum, während alle Platten der Sporenbildner dicht besiedelt waren. Die gleichen Stämme wurden in einem 2. Versuch gleicher Anordnung nochmals einer Pasteurisierung unterworfen. Um jedoch den letzten etwa überlebenden Keim der Nichtsporenbildner, vor allem der Schleimbildner, zu erfassen, wurde nach der Pasteurisierung der ganze Ampulleninhalt gleich nach der schnellen Abkühlung zwecks Anreicherung in Milchzuckerbouillon gebracht, 48 Std. bebrütet, und dann erst Plattenausstriche angelegt. Es zeigte sich jedoch das nämliche Bild wie beim 1. Versuch.

3. Nachweis des Eiweißabbaues in Milch durch Bestimmung des Aminosäurestickstoffes (nach van Slyke).

Zu dieser Prüfung wurden 11 Stämme ausgewählt, 2 Mikrokokken (2 u. 6), 1 Streptokokkus (10), ein Vertreter der Coryne- und Mycobakteriengruppe (18), je ein Vertreter der Alcaligenes-, Fluoreszens- und Proteus-Gruppe (24, 28, 21), 4 Sporenbildner (29, 33, 35, 39). Zur Anwendung gelangten 500 ccm-Erlenmeyerkolben mit je 300 ccm Milch, die genau so wie die zur Titration verwendeten Kolben sterilisiert, vorbehandelt und beimpft wurden.

Eiweißabbau in Milch. Nachweis durch die Aminosäurebestimmung nach van Slyke.

Stamm	Amino-N in mg in 10 ccm Milch nach										
	2 Tagen	7 Tagen	14 Tagen	3 Wochen	4 Wochen	5 Wochen	6 Wochen	8 Wochen	10 Wochen	13 Wochen	17 Wochen
2	0,57	0,86	1,13	1,41	2,25	2,90	3,38	6,78	18,65	27,11	34,39
6	2,55	2,91	3,33	5,96	9,18	9,83	11,32	14,09	18,42	21,38	32,15
10	1,24	1,71	2,03	2,53	2,57	2,59	2,64	2,66	2,83	5,67	6,52
18	1,30	1,71	2,09	2,42	3,39	4,34	5,58	7,55	9,44	12,73	14,39
21	4,02	4,16	5,29	7,53	10,62	11,27	12,99	16,91	21,53	23,15	33,54
24	3,68	7,58	10,94	19,67	20,26	20,85	21,14	22,17	22,86	23,10	23,24
28	2,39	5,22	8,14	12,20	19,10	19,71	20,58	21,89	22,65	23,16	23,81
29	1,70	2,34	2,93	3,37	4,59	5,84	7,64	10,88	14,75	21,83	27,76
33	2,32	3,19	3,95	4,89	5,63	6,07	7,97	8,45	10,51	15,01	18,21
35	3,62	4,22	6,15	7,76	9,70	11,50	14,83	17,47	20,40	22,69	25,01
39	4,81	7,01	9,64	11,58	14,35	14,74	15,94	16,06	17,62	19,33	21,30

Die Kulturen wurden 24 Std. bei 30° C bebrütet und dann bei Zimmertemperatur im Glaskasten aufbewahrt, um einer zu starken Verdunstung vorzubeugen. Zur Bestimmung des Aminostickstoffes wurde die Methode nach van Slyke gewählt. Um möglichst geringe Fehlerquellen zu schaffen, wurden stets 10 ccm ausgeschüttelt (Milchkulturen). Bei starkem Schäumen, das nicht bei allen Kulturen und nur in gewissen Stadien auftrat, wurde das zu untersuchende Material mit einigen Tropfen Octylalkohol versetzt. Die Bestimmungen gingen fraktioniert vor sich. Die beigefügte Tabelle bringt zum Ausdruck, wieviel Milligramm Aminostickstoff innerhalb der einzelnen Zeitabschnitte gebildet wurden. Auffallend war, daß die Mikrokokken (2 und 6) den meisten Aminostickstoff zu bilden vermochten, noch weit größere Mengen als die typischen Fäulnisbakterien, mit Ausnahme

des Bakterienstammes 21 aus der Proteus-Gruppe, der ungefähr dieselbe Menge bildete. Der Streptokokkus 10 wies nur ein sehr geringes Aminostickstoff-Bildungsvermögen auf. Der Vertreter der Coryne- und Mycobakterien-Gruppe 18 vermochte ebenfalls keine großen Mengen Aminostickstoff zu bilden, doch immerhin noch über das Doppelte des Streptokokkenstammes. Die Vertreter der Alcaligenes- und Fluoreszens-Gruppe waren von der vierten Woche an gleichwertig, zu Anfang dagegen zeigte Alcaligenes ein schnelleres Abbauvermögen. Bei den Sporenbildnern besaß der Bac. mycoides-Stamm 33 die geringste Fähigkeit zur Aminostickstoffbildung, ihm folgten aufwärts Bac. megatherium 39, mesentericus 35 und subtilis 29.

Um zunächst festzustellen, wieviel Gesamtstickstoff in der Milch vorhanden war, wurden 2 ccm einer frisch sterilisierten Kontrollmilch nach der Mikro-Kjeldahl-Methode verbrannt, destilliert und titriert. Der Versuch wurde in 4facher Ausführung durchgeführt. Die Titrationen aller 4 Destillate ergaben im Mittel 9,8 mg N für 2 ccm Milch bzw. 49 mg N für 10 ccm frisch sterilisierte Magermilch. Diese mg-Zahl stimmt ungefähr mit den von Miethke und Finzenhagen gefundenen Zahlen überein, die in 100 ccm Milch in 3 Milchproben — es handelt sich um Rohmilch — 462,0, 485,0 und 497,5 mg N feststellten. Da es sich bei den eigenen Untersuchungen um sterilisierte Magermilch handelte, so stimmt der gefundene Wert ziemlich genau mit dem mittleren Wert überein, denn dieser Wert (485,0) ist um ca. 1% zu erhöhen, um den Prozentsatz, den die Magermilch bei der Sterilisiation an verdampften Wasser verliert. Trotz dieses Wertes aus frisch sterilisierter Magermilch waren die hohen Zahlen der Aminostickstoff-mg immer noch nicht recht verständlich, deshalb lag es nahe, auch vor längerer Zeit sterilisierte Milch auf ihren Gesamtstickstoff hin zu untersuchen. Dieser Versuch wurde mit der 12 Wochen alten Kontrollmilch durchgeführt und brachte, wie es nicht anders zu erwarten war, einen weit höheren Gesamt-N-Wert für 10 ccm Milch, nämlich im Mittel einen Wert von 64,4 mg N für 10 ccm altsterilisierter Milch. Diese höhere mg-N-Zahl war lediglich auf die Verdunstung der Milch innerhalb der 12 Wochen zurückzuführen. Die Verdunstung der Milchkulturen ist in der Tabelle nicht berücksichtigt, die eingetragenen Zahlen deshalb mit zunehmendem Alter der Kulturen etwa 10—25% zu hoch.

4. Prüfung auf Säuerung verschiedener Kohlehydrate u. dgl.

Um verschiedene Kohlehydrate mit den verschiedenen Stämmen zusammen auf Säurebildung zu prüfen, wurde die „Zuckerreihe" in 7proz. Lackmusbouillon mit 2% der jeweiligen Kohlehydratzusätze u. dgl. ausgeführt. Lackmusbouillon wurde gewählt, um gleichzeitig das Reduktionsvermögen und die Trübung festzustellen. Zur Verwendung kamen folgende Zucker: von den Monosacchariden die Pentosen: Arabinose und Xylose; die Hexosen: Dextrose, Mannose, Galaktose und Fruktose sowie das Glykosid: Salicin; von den Disacchariden: Saccharose, Maltose und Laktose; von den Trisacchariden: Raffinose; von den Polisacchariden: Stärke und Dextrin; von den Alkoholen: Glyzerin, Mannit und Sorbit. Untersucht wurden die Mikrokokkenstämme 2 und 6, der Streptokokkus 10, 2 Vertreter der Coryne- und Mycobakterien-Gruppe (15 und 18), je ein Vertreter der Alcaligenes-

und Fluoreszens-Gruppe (25 und 27) und die beiden Sporenbildner 35 und 39. Die Stämme 6, 15, 18 und 25 säuerten keines der untersuchten Kohlehydrate.

Stamm 2 säuerte: Arabinose, Xylose, Dextrose, Fruktose, Saccharose, Maltose und Sorbit.

Stamm 10 säuerte: nur Galaktose.

Stamm 27 säuerte: Arabinose, Dextrose, Mannose, Fruktose, Saccharose, Stärke, Glyzerin, Mannit und Sorbit.

Stamm 35 säuerte: Arabinose, Xylose, Dextrose, Salicin, Mannose, Fruktose, Saccharose, Maltose, Starke, Dextrin, Glyzerin und Sorbit.

Stamm 39 sauerte: alle untersuchten Zucker und Alkohole, darunter auch zu Anfang Laktose und Raffinose.

Wie aus diesen Untersuchungen hervorgeht, säuerte kein Stamm mit Ausnahme von St. 39, der Laktose anfänglich säuerte, den Milchzucker.

5. Reduktion von Lackmusfarbstoff.

Die Reduktion des Lackmusfarbstoffes wurde, wie erwähnt, gleichzeitig mit der „Zuckerreihe" beobachtet. Das Reduktionsvermögen sowie auch die Art der Entfärbung durch die einzelnen Stämme war bei den verschiedenen Zusätzen nicht immer gleich. Allgemein begann die Reduktion sehr spät.

St. 2 vermochte lediglich die Lackmusbouillon mit Glyzerinzusatz nach 15 Tagen in der Kuppe zu reduzieren, während sonst nirgends mit diesem Mikrokokkus Entfärbung auftrat.

Bei St. 6 begann die Reduktion des Lackmusfarbstoffes bei Stärke-, Glyzerin- und Mannitzusatz schon nach 48 Std. von unten, während bei den anderen Zusätzen mit Ausnahme von Raffinose noch keine Entfärbung beobachtet wurde. Nach 4 Tagen war die Lackmusbouillon bei allen Zusätzen z. T. vollkommen, z. T. schwach entfärbt, z. T. ging die Reduktion hier lediglich von unten bis 2 cm unter die Oberfläche. Nach 40 Tagen war fast überall eine Reoxydation des Farbstoffes eingetreten.

St. 10 vermochte lediglich bei Anwesenheit von Galaktose den Lackmusfarbstoff erst nach 7 Tagen völlig zu reduzieren, bei sehr starker Trübung. Die Reoxydation setzte bereits einen Tag später langsam ein, so daß schon nach 25 Tagen die Bouillon wieder blau gefärbt war.

St. 15 reduzierte den Lackmusfarbstoff bei Anwesenheit von Salicin, Laktose, Galaktose, Stärke und Dextrin auch nach 40 Tagen nicht. Bei Xylose- und Maltosezusatz war nach 7 bzw. 9 Tagen lediglich die Kuppe reduziert und nach 8 bzw. 15 Tagen wieder reoxydiert. In Arabinosebouillon wurde nach 7 Tagen die untere Hälfte vollständig aufgehellt, die Entfärbung war nach 48 Std. wieder verschwunden. Der Lackmusfarbstoff wurde bei Gegenwart der restlichen Zusätze bis auf einen oberen schmalen Streifen vollkommen reduziert. Nach 40 Tagen war überall wieder vollendete Reoxydation festzustellen. Die Bouillon war stets klar mit dünner trockener Haut.

St. 18 vermochte in Salicin-Lackmusbouillon keine Reduktion hervorzurufen; Maltose- und Stärkeanwesenheit ließen nur eine langsame schwache Reduktion in der Kuppe aufkommen, die jedoch bald wieder verschwand. Bei allen anderen Zusätzen wurde der Lackmusfarbstoff bis auf einen obersten schmalen Streifen reduziert. Auch bei St. 18 war nach 40 Tagen vollkommene Reoxydation zu beobachten. Die Bouillon blieb stets klar; auf der Oberfläche hatte sich eine dicke, trockene, krümelige Haut gebildet, die schließlich wie ein dicker brauner, poröser Pfropfen über der Flüssigkeit stand.

Bei St. 25 war nach 7 Tagen nur bei Raffinose und Glyzerin Reduktion zu beobachten. Die Entfärbung war bei Raffinosegegenwart nach 10 Tagen bis auf einen schmalen oberen Ring vollständig, während die Reduktion in Glyzerinbouillon nach 21 Tagen vollkommen war. Bei Raffinose konnte nach 12 Tagen, bei Glyzerin nach 40 Tagen vollständige Reoxydation festgestellt werden. Die Bouillon wurde schnell trübe und später milchig, zu einer Hautausbildung kam es nicht, sondern nur zur Ringbildung am Glasrand.

Die Reduktion bei St. 27 war sehr mannigfaltig. Die Lackmusbouillon mit Laktosezusatz wurde gar nicht reduziert. Bei Anwesenheit von Galaktose und Raffinose war nur eine schwache Entfärbung von unten zu beobachten, die nach 18 bzw. 25 Tagen einer Reoxydation gewichen war. Bei allen anderen Zusätzen wurde die Bouillon entweder gleich von oben aufgehellt oder erst unter einer 1—2 cm tiefen, unveränderten Zone, 1—2 cm tief. Nach 8—10 Tagen war die Bouillon meist vollständig reduziert. Diese Verschiedenheiten der Entfärbung werden offenbar durch Anwesenheit bzw. Abwesenheit einer Haut verursacht. Bei Galaktose und Raffinose war die Haut nur sehr dünn und ungeschlossen, während sie bei den übrigen Zusätzen stärker und fester war. Bei stärkerer, geschlossener Haut begann die Reduktion gleich unter der Oberfläche; war die Haut nicht so fest, begann die Entfärbung erst unter einer unentfärbten Zone.

Ein ähnliches Bild zeigte der St. 35. Laktose wurde ebenfalls nach 40 Tagen nicht reduziert. Bei Galaktose und Glyzerin begann die Reduktion von unten, ebenso bei Fruktose, und schritt dann nach oben fort. Bei allen anderen Zusätzen begann die Reduktion 1 cm unter der Oberfläche und schritt nach unten fort. Der Unterschied ist auch hier durch die verschiedene Hautbildung zu erklären. In Galaktose, Fruktose und Glyzerin wurde eine dünnere und ungeschlossene Haut auf der Flüssigkeitsoberfläche gebildet; die Bouillon der anderen Zusätze hatte sich dagegen mit einer festeren Haut überzogen. Nach 40 Tagen wurde überall wieder Blaufärbung (Reoxydation) beobachtet, mit Ausnahme bei Saccharose- und Mannitzusatz.

St. 39 reduzierte den Lackmusfarbstoff stets von unten. Die Lackmusbouillon blieb bei Gegenwart von Dextrose, Salicin und Saccharose unentfärbt. Bei allen anderen Zusätzen wurde die Bouillon bis auf den obersten schmalen Ring vollkommen entfärbt. Nach 40 Tagen war nur die Bouillon mit Mannosezusatz noch stark und gleichmäßig reduziert; bei sämtlichen anderen Zusätzen war der Farbstoff reoxydiert.

Worauf die Unterschiede der Reduktion und Reoxydation des Lackmusfarbstoffes bei den einzelnen untersuchten Arten in den verschiedenen Zusätzen zurückzuführen war, konnte nicht eindeutig entschieden werden. Der Hauptgrund der verschiedenen Reduktion liegt wahrscheinlich in der Hautbildung, andere Gründe könnten in der verschiedenen Ausnutzung der einzelnen Zusätze für den Stoffwechsel von Bedeutung sein. Das Auftreten der verschiedenen Reoxydationen nach längerer Zeit könnte evtl. durch ein Absterben der Bakterien zu erklären sein, da hiermit der ganze Stoffwechsel aufhört. Die sich etwa gebildete Haut wird locker, rissig oder löst sich von der Glaswand, so daß der Luftsauerstoff ungehindert von oben her in die Flüssigkeit hineindiffundieren und somit durch den Fortfall der Sauerstoffzehrung durch die Bakterien die Reoxydation bewirken kann.

D. Zusammenfassung.

Aus Rohmilch wurden 40 Stämme von sog. Alkalibildnern isoliert, auf ihre wichtigsten morphologisch-physiologischen Eigenschaften und auf ihre Bedeutung für die Qualität von Milch und Milcherzeugnissen untersucht. Die Versuche hatten folgendes Ergebnis:

1. Die physiologische Gruppe der Alkalibildner der Milch und Milchprodukte im engeren Sinne besteht aus solchen Bakterien, die auf Chinablau-Milchzuckeragar-Nährböden den Chinablaufarbstoff ohne vorhergehende Blaufärbung sofort kräftig aufhellen.

Zu einer weiteren Gruppe sind die Alkalibildner mit einer anfangs geringen Säurebildung in Milchzucker-Chinablauagar und mit einer Säuerung in Traubenzucker-Chinablauagar zu stellen.

2. Die isolierten Alkalibildner gehörten folgenden Bakteriengruppen an (in der Reihenfolge der Häufigkeit): Mikrokokken, Coryne- und Mycobakterien, Sporenbildner, Streptokokken, Alcaligenes, Fluoreszens, Proteus und Sarcinen.

3. Die Alkalibildner sind, falls ihr Wachstum in der Milch durch Fehlen säuerungskräftiger Milchsäurebakterien ermöglicht wird, für die Qualität von Milch und Milchprodukten im allgemeinen als unerwünscht anzusehen.

4. In Milch können durch ihre Gegenwart vorzeitige Gerinnung infolge Labbildung, ferner Schleimbildung und abweichende Geruchs- und Geschmacksstoffe erzeugt werden.

5. Eine Reihe von Alkalibildnern (Sporenbildner, Streptokokken aus der Gruppe des Bact. lactis viscosum) sind kräftige Fettspalter und können durch Erzeugung der Fehler „alt" und „ranzig" die Ursache schlechter Haltbarkeit der Butter sein.

6. Für die Weichkäserei ist ein Teil der untersuchten Alkalibildner (Mikrokokken, Coryne- und Mycobakterien) wahrscheinlich als nicht unerwünscht anzusehen, da sie gegen Salz widerstandsfähig, bei der Käsereifungstemperatur gut wachsen und das Kasein langsam abbauen.

7. Keiner der nichtsporenbildenden Alkalibildner überstand bei Versuchen mit Ampullen im Wasserbad die Dauerpasteurisierung (½ Std. 63° C).

8. Als leicht erkennbares Merkmal für eine bei den Alkalibildnern nicht selten vorkommende anfängliche Säurebildung in Milch erwies sich der Chinablau-Milchzucker-Agarstich. Alle Stämme, die im unteren Teile des Stiches Blaufärbung hervorriefen, säuerten auch zu Anfang in geringem Maße die Milch, ohne eine Säuregerinnung hervorzurufen. Die Alkalibildung in der Milch war bei einigen Arten (Mikrokokken, Proteus, Fluorescens, Bact. lactis viscosum, Sporenbildner) recht beträchtlich.

9. Die bekannte Beobachtung, daß in manchen Fällen auf festen Nährböden trotz Zusatzes eines Indikators weder die Säure- noch Alkalibildung festzustellen ist, erklärt sich aus der Reduktion des Farbstoffes durch die Bakterien. Die Versuche mit Lackmusfarbstoff ergaben, daß die Reduktion fast stets auf Sauerstoffmangel zurückzuführen ist. Oft trat nach längerer Aufbewahrung eine Reoxydation des Farbstoffes ein. Die Bedingungen für das Wiederauftreten der Farbe konnten vorläufig noch nicht eindeutig bestimmt werden. Verschiedene Erklärungsmöglichkeiten wurden angeführt.

Literaturnachweis.

Adametz, L., Untersuchungen über Bacillus lactis viscosus, einen weit verbreiteten milchwirtschaftlichen Schädling. (Landw. Jahrbuch. Bd. 20. 1891. S. 185.) — Ayers, S. H., and Rupp, P., The alcali-forming Bacteria found in milk. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 45. 1916. S. 382.) — Baerthlein, H., Über choleraähnliche Vibrionen. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 67. 1912. S. 321—335.) — Becker, W., Bakteriologische Studien über Molkereigebrauchswasser unter besonderer Berücksichtigung der Lebensfähigkeit einiger Bakterien in Wasser. Inaug.-Diss. Kiel 1929. — Bitter, H., Zur Methode des Typhusbakterien-Nachweises in Stuhl und Urin. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 59. 1911. S. 474.) — Burckhardt, J. L., Die Begeißelung als differential-diagnostisches Merkmal in der Fluorescens-Gruppe. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 79. 1917. S. 321—324.) — Christiansen, W., Das Wesen der Reduktaseprobe und ihre Bedeutung für die Praxis. (Milchw. Ztg. Lübeck. Nr. 42. 1926.) — Conn, H. W. et Esten, W. M., Le développement comparativ des différentes espèces microbiennes dans le lait. (Revue génerale du lait. T. 1. 1901/02. p. 121.) — Cahon, F., Über das Reduktionsvermögen der Bakterien. (Ztschr. f. Hyg. Bd. 2. 1887. S. 386—396.) — Demeter, K., Studien über Milchsäurestreptokokken. (Milchw. Forsch. Bd. 5. 1928. S. 505—531.) — Demeter, K., Bedeutung, Bekämpfung und Nachweis der sporenbildenden Bakterien in Milch. (Südd. Molk.-Ztg. Kempten i. Allgäu. Nr. 15. 1930.) — Demeter, K., Betrachtungen über die Reduktaseprobe und die Brauchbarkeit von Methylenblau und Azurufin. (Dtsch. Molk.-Ztg. Kempten i. Allgäu. Nr. 32. 1934.) — Demnitz, A., Ein Beitrag zur Rolle des B. proteus bei bakteriellen Nahrungsmittel-Vergiftungen. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 98. 1926. S. 141—145.) — Drewes, K., Über die Baktericidie der Milch. Inaug.-Diss. Kiel 1926. — Frieber, W., Beiträge zur Frage der Indolbildung und der Indolreaktionen sowie zur Kenntnis des Verhaltens indolnegativer Bakterien. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 87. 1922. S. 255—277.) — Gubitz, H., Kältebakterien mit besonderer Berücksichtigung ihrer Bedeutung für die Milchwirtschaft. Inaug.-Diss. Kiel 1927. — Henneberg, W., Handbuch der Gärungsbakteriologie. II. Aufl. Bd. 1 u. 2. 1926. — Henneberg, W., Die Wichtigkeit der Federstrichkulturen für die bakt. Untersuchungen in milchwirtschaftlichen Laboratorien. (Molk.-Ztg. Hildesheim. Nr. 131. 1928.) — Henneberg, W., Zur Kenntnis der Alkalibildner in Milch. (Milchfehler und ihre Bekämpfung.) (Milchw. Forsch. Bd. 12. 1931. Heft 3.) — Henneberg, W., Über die Bakterien im gesunden Kuheuter. (Molk.-Ztg. Hildesheim. Nr. 92, 94, 95, 97, 98 u. 100. 1932.) — Henneberg, W., Zur Kenntnis der Erreger der schleimigen Milch. (Molk.-Ztg. Hildesheim. Nr. 64, 65 u. 66. 1933.) — Henneberg, W., Bakteriologische Molkereikontrolle. 1934. — Holzmüller, K., Die Gruppe des Bacillus mycoides Flügge. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 23. 1909. S. 304—354.) — Huttig, C., Statistische Untersuchungen an Bakterienarten der Fluorescens-Gruppe. (Milchw. Forsch. Bd. 8. 1929. Heft 5 u. 6.) — Kißkalt, K. und Berend, E., Untersuchungen über die Gruppe der Diphteroiden. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 81. 1918. S. 444—447.) — Klimenko, W. N., Die Gruppe des Bac. faecalis alcaligenes. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 43. 1907. S. 755—774.) — Lantzsch, K., Beiträge zur Kenntnis der Fluorescens-Gruppe. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 87. 1922. S. 81—95.) — Lehmann, K. B. und Neumann, R. O., Bakteriologische Diagnostik. 7. Aufl. Bd. 1 u. 2. 1927. — Lieske, R., Kurzes Lehrbuch der allgemeinen Bakterienkunde. 1926. — Lieske, R., Untersuchungen über die Krebskrankheit bei Pflanzen, Tieren und Menschen. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 108. 1928. S. 127.) — Matzuschita, T., Bakteriologische Diagnostik. 1902. Mehlhose, H., Einige Reduktaseversuche unter besonderer Berücksichtigung der Janusgrün-Reduktase. (Südd. Molk.-Ztg. Kempten i. Allgäu. Nr. 33. 1928.) — Miethke, M. und Finzenhagen, H., Mikromethoden in der Milchanalyse. II. Mitt.: Die mikro-analytische Bestimmung des Gesamtstickstoffes, des Kaseins und des Albumins in der Milch. (Milchw. Forsch. Bd. 14. 1933. S. 187—194.) — Migula, W., System der Bakterien. Bd. 2. 1900. — Perlberger, J., Über die fermentative Bedeutung der Gruppe des B. mycoides und seiner nächsten Verwandten auf Kohlehydrate nebst einigen Bemerkungen über die Morphologie dieser Gruppe. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 62. 1924. S. 1—15.) — Pribram, E. und Pulay, E., Beiträge zur Systematik der Mikroorganismen. 1. Gruppe des Bact. fluorescens. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 76. 1915. S. 321—329.) — Pollak, R., Über Formenwechsel bei dem Bacillus faecalis alcaligenes. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 68. 1913. S. 288—291.) — Rabino-

witsch, L., Tuberkelbazillen in der Marktbutter. (Ztschr. f. Hyg. Bd. 26. 1897. S. 101.) — Rona, P., Mikro-Kjeldahl-Methode, Anordnung von Bang. Praktikum der physiologischen Chemie. I. Teil: Fermentmethoden. II. Aufl. 1931. S. 334. — van Slyke, D. D., Die gasometrische Bestimmung von primärem aliphatischen Aminostickstoff und ihre Anwendung auf physiologisch-chemischem Gebiet. (Handb. d. biol. Arbeitsmethoden. Abderhalden. Abt. I: Chem. Methoden. Teil 17. 1923, S. 263—279.) — Stolze, H., Pathogene Mikrokokken in der Milchwirtschaft, unter besonderer Berucksichtigung der physiologischen Eigenschaften. Inaug.-Diss. Kiel 1930. — Strecker, J., Untersuchungen über Bact. alcaligenes L. et N. (Bacillus faecalis alcaligenes Petruschky). Med. Diss. Würzburg 1917. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 51. 1920. S. 378.) — Tobler, M., Vorkommen von Tuberkelbazillen in Marktbutter. (Ztschr. f. Hyg. Bd. 36. 1901. S. 139.) — Vogeler, L., Über sporenbildende Bakterien im Darmkot des gesunden Rindes unter der Berucksichtigung ihrer Bedeutung fur die Milchwirtschaft. Inaug.-Diss. Kiel 1930. — Weigmann, H. und Gruber, Einige bakteriologische Untersuchungen aus der milchwirtschaftlichen Praxis. (Milchw. Centralbl. 1905. S. 3.) — Weigmann, H. und Wolff, A., Über die Flora der frischen und pasteurisierten Milch einer Viehherde bei Weidegang und Stallhaltung. (Forsch. a. d. Gebiete d. Milchwirtsch. u. d. Molkereiwesens. Bd. 2. 1922. S. 42.) — Weigmann, H., Die Pilzkunde der Milchwirtschaft. II. Aufl. 1924. — Wirth, E., Zur Kenntnis der Streptokokken. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 99. 1926. S. 266—292, 438—460.) — Wolff, A., Zur Kenntnis der Veranderungen in der Bakterienflora der frischen Milch. Die alkalibildenden nicht verflüssigenden Stabchen. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 20. 1908. S. 762—765.)

Die Feulgen'sche Nuklealreaktion bei Bakterien und Hefen.

[Aus dem Mikrobiologischen Laboratorium der Akademie der Wissenschaften Leningrad, USSR.]

Von A. Imšenecki.

Mit 1 Abbildung im Text.

Die in zytologischen Arbeiten veröffentlichten Ansichten über Bakterienkerne sind nicht übereinstimmend. Methodische Schwierigkeiten und verschiedene Deutung der in den Zellen beobachteten morphologischen Veränderungen haben zu widersprechenden Schlußfolgerungen Grund gegeben. Die Ansicht Haeckels, daß Bakterien Achromatinobionten sind, wird neuerdings von einigen Verff. wieder hervorgehoben (Alexeieff), während andere über Chromosomenspaltung und Chromatinreduktion bei Bakterien berichten (Badian). Die meisten Arbeiten schlagen einen Mittelweg zwischen diesen sich schroff gegenüberstehenden Ansichten ein und nehmen an, daß der Kernstoff in den Bakterien diffus verteilt ist und in Körnern „ausfällt“ oder der Fähigkeit zur Entmischung entbehrt.

Festzustellen, daß die in der Zelle wahrnehmbaren Körner aus Chromatin bestehen, ist eine der Aufgaben, die beim Studium des Bakterienkernes am häufigsten auf Schwierigkeiten stoßen. Die von Feulgen und Roßenbeck 1924 vorgeschlagene Nuklealreaktion erwies sich daher für die mikrochemische Methodik höchst wertvoll, indem sie ermöglichte, den Chromatingehalt der Körner festzustellen und dieselben von Reservestoffen zu unterscheiden. Im Verlauf der letzten Jahre sind mehrere Arbeiten über die Feulgensche Reaktion bei Mikroorganismen veröffentlicht worden. Im folgenden führen wir kurz ihren Inhalt an.

Feulgen und Rossenbeck, die Verff. der Methodik, erhielten bei Untersuchung von Preß- und Bierhefe negative Ergebnisse. Hefekerne enthalten pentosehaltige Nukleinsäuren, die nach Ansicht der Verff. nicht positiv reagieren. Bei Bakterien aus Reinkulturen, Eiterbakterien und Trypanosomen trat die charakteristische Farbung gleichfalls nicht auf.

Voit veröffentlichte 1927 zwei Arbeiten. In der einen wird die positive Nuklealreaktion bei Hefe beschrieben, in der anderen diffuse Färbung mikroskopischer Bakterienpräparate. Untersucht wurden B. coli, B. paratyphi B, B. mesentericus und B. pyocyaneum. Am starksten ausgesprochen war die Reaktion bei B. pyocyaneum. Verf. empfiehlt Kultivieren der Bakterien auf synthetischen Nährböden, da Agar an und für sich positiv reagiere.

Die Ergebnisse der Untersuchungen von Voit in bezug auf die Hefekerne wurden weiterhin durch die Arbeiten von Jiroweck, Neumann, Peter und Rochlina bestätigt und damit endgultig festgestellt, daß Hefezellen positiv reagierende Nukleinsäuren enthalten. Was die Bakterien anbetrifft, so fiel die Reaktion bei den von Cuhna und Muniz mit Treponema duttoni und T. hispanicum vorgenommenen Untersuchungen negativ aus. Bei Bearbeitung von Präparaten des B. anthracis hingegen erhielten die Verff. isolierte, gefärbte Körner im mittleren Teil der Bakterien. Meist befanden sich in den Zellen 2 Kornchen, seltener war ein stabchenförmiges Gebilde vorhanden. Die Sporen farbten sich bei der Bearbeitung nicht. Die genannte Arbeit war die erste uber positiv reagierende Körner bei Bakterien.

Neumann stellte 1930 bei verschiedenen Bakterien (Kokken, Stäbchen, Spirochaten) gleichmaßig in der Zelle verteilte Kernsubstanz, die sich diffus violett farbte, fest. Besonders überzeugend waren die Präparate von Azotobacter chroococcum. Bei der Teilung und Sporenbildung sammelt sich bei verschiedenen Bakterien die Kernsubstanz in isolierten Kornern, die Ähnlichkeit mit Kernen haben und positiv reagieren.

Pokrowskaja stellte bei B. pestis Kerne fest, die sich in einer bestimmten Entwicklungsphase dieser Bakterien bilden und positiv nach Feulgen reagieren. Kuhn und Sternberg fanden mittels der Feulgenschen Methode Kerne in Pettenkoferien, die Teilung ist bei letzteren von amitotischer Kernteilung begleitet.

Kuzela stellte bei verschiedenen Bakterien positive Reaktion fest, und zwar farbte sich die Zelle im ganzen — Korner wurden nicht beobachtet. Gleichfalls diffuse Färbung fanden Stapp und Bortels bei Pseudomonas tumefaciens.

Interessante Ergebnisse veroffentlichte 1932 Thomas. In den Zellen des von ihm isolierten Bac. Calmettei (nov. spec.) befanden sich nicht nur isoliert gelegene Korner, sondern auch eigenartige chromophile Zonen, welche die Zelle durchquerten. Zonen und Korner färbten sich nach Feulgen. Positiv reagierten auch 2 in der Spore befindliche Kornchen.

Untersuchungen von Pietschmann und Rippel mit B. mycoides, B. subtilis, B. megatherium, Azotobacter, Sarcina u. a. fuhrten zu folgenden Schlußfolgerungen. Positiv reagierende Kernsubstanz ist bei Bakterien in normalem Zustande diffus verteilt. Bei Zellteilung verteilt sich die Kernsubstanz nicht gleichmäßig zwischen den beiden neuen Zellen. Die Prospore farbt sich, jedoch tritt nicht die gesamte Kernsubstanz in die Spore, sondern ein Teil derselben verbleibt in der Zelle. Reife Sporen reagieren stets negativ. Nur unter besonderen Bedingungen (Kultivieren auf Li-enthaltenden Nährböden) treten in den Zellen grobe Körner auf, die positiv reagieren. Peter beschreibt bei Sarcina gigantea (nov. sp.) ein kernähnliches Körperchen, das positive Reaktion aufweist. 3 andere vom Verf. untersuchte Bakterien, B. megatherium, B. mycoides und B. malvacearum, ergaben diffuse Färbung der Zellen. In älteren Kulturen färbt sich die Prospore.

Imšenecki untersuchte die Struktur des Granulobacter pectinovorum und fand, daß die Kernsubstanz dieses Mikroorganismus nach Feulgen positiv reagiert. In jungen Zellen sieht man gleichzeitig diffuse Färbung und gefärbte Körner. In älteren Kulturen färben sich die Prospore, die chromophilen Zonen in Gestalt von „Gürteln" und die terminalen Sprossen, mittels welcher sich der Mikroorganismus vermehrt. Je mehr die Prospore zunimmt, um so schwächer wird die diffuse Färbung der Zelle.

Alle oben angeführten Arbeiten können in 2 Gruppen eingeteilt werden. Die eine Gruppe umfaßt Untersuchungen, in denen nur diffuse Färbung

der Bakterien festgestellt wurde, die andere enthält Arbeiten, in denen außerdem über in der Zelle befindliche und positiv reagierende Körner berichtet wird. Die Präparate wurden bei diesen Untersuchungen wie üblich bereitet: nach 3—4stünd. Einwirkung von Fuchsinschwefelsäure, Übertragung in Wasser mit Zusatz von SO_2, darauf Trocknen und Untersuchung oder vorhergehendes Einbetten in Kanadabalsam. Bei diesen Bedingungen kann sich die Fuchsinschwefelsäure leicht zersetzen und das freigewordene Fuchsin wird ersichtlich vor allem von den in der Zelle enthaltenen Körnern oder von der Prospore adsorbiert. Bei stärkerer Dissoziation des Reagens von Schiff kann diffuse Färbung der ganzen Zelle eintreten. In dieser Hinsicht überzeugend sind die Untersuchungen von Wermel. Verf. bearbeitete Hydrazellen mit Fuchsinschwefelsäure und setzte die Präparate darauf ins Wasser (ohne SO_2), unter welchen Bedingungen Färbung des Nukleolus, der sonst negativ reagierte, eintrat. Die Zellstruktur färbt sich dabei natürlich nicht typisch violett, sondern rötlich. Im Gegensatz zu Feulgen, ermöglicht nach Ansicht des Verf.s der Charakter der Färbung nicht irrtümliche Ergebnisse zu unterscheiden. Die Frage wird noch verwickelter durch den Umstand, daß selbst bei regelrecht ausgeführter Reaktion Monoaldehydverbindungen rötliche Färbung verursachen, im Gegensatz zu Dialdehydverbindungen, die violette Färbung hervorrufen. Anscheinend ist der chemisch verschiedene Bestand der Kernsubstanz die Ursache der verschiedenen Färbung der Kerne in Pflanzenzellen. Z. B. färben sich die Kerne der höheren Pflanzen und einiger niedriger (Saprolegnia, Euglena, Diatomeae) violett, während Cyanophyceae und einige Bakterien (Sarcina) sich rot färben (Petter).

Diese Erwägungen veranlaßten uns, die Methodik der Feulgenschen Reaktion einigermaßen zu verändern. Da es sich bei der besprochenen Reaktion, wie festgestellt, nicht um eine einfache Färbung, sondern um eine mikrochemische Reaktion handelt, nahmen wir an, daß die Färbung schon eintreten würde, während das Präparat noch im Reagens lag, d. h. während seines Aufenthaltes in der Fuchsinschwefelsäure. Alle anderen Veränderungen die bei weiterer Bearbeitung des Präparates eintreten würden, seien von sekundärer und nicht spezifischer Bedeutung. Von diesen Tatsachen ausgehend, entschieden wir uns für die folgende Methodik.

Material und Methodik.

Untersucht wurden folgende Bakterien: Micrococcus aurantiacus, M. flavus, B. fluorescens liquefaciens, B. prodigiosum, Proteus vulgaris, B. Coli, Bac. mesentericus, B. mycoides, B. asterosporus, B. ellenbachensis, B. tumescens und B. megatherium.

Im ganzen wurden 12 Bakterienarten in Kulturröhrchen auf Fleisch-Pepton-Schrägagar bei 25° kultiviert. Parallel wurden Bakterien auf folgenden synthetischen Nährböden kultiviert:

Synthetischer Nährboden Nr. 1 (Fetscher und Zirkles)		Synthetischer Nährboden Nr. 2	
Schwefelsaures Magnium	0,04	Schwefelsaures Magnium	0,3
Natriumchlorid	0,5	Natriumchlorid	1,0
Dinatriumphosphat	0,22	Dinatriumphosphat	1,0
Monokaliumphosphat	0,18	Monokaliumphosphat	1,0
Harnstoff	0,25	Asparagin	5,0
Asparagin	0,25	Natriumcitrat	5,0
Glukose	1,0	Wasser	500,0
Wasser	100,0		

Was die Hefearten anbetrifft, so schien uns das Studium des Kernes der kleinzelligen Hefearten besonders geeignet. Da Saccharomyces bacillaris in unserem Laboratorium fehlte, waren wir auf die Kulturen von Debaryomyces tyrocola (Konokot.) und auf die hefeähnlichen Pilze Mastigomyces Philippovi (Imšenecki und Kriss) angewiesen, deren Zellen 4—4,5 μ Größe nicht übersteigen. Als gut bekannte Vertreter der Hefearten wurden außerdem noch Saccharomyces cerevisiae Rasse XII und Zygosaccharomyces mandschuricus (Saito) untersucht.

Kultiviert wurde auf Bierwurze-Agar. Der Belag wurde mit der Platinose vorsichtig von dem festen Nahrboden entfernt und in Zentrifugierrohrchen, die bis zur Hälfte mit 96° Alkohol, der 1% Dimedont (dimethyl cyclohexandion) enthielt, angefüllt waren, übertragen. Die genannte Verbindung wird bei der Feulgenschen Reaktion als aldehydbindend empfohlen. Da die Farbe der Niederschläge nur bei gleichen Mengen derselben vergleichbar ist, wurden die Zentrifugierrohrchen mit gleichen Mengen Bakterienmasse versehen. Die folgenden 2 Tage wurde der Inhalt der Rohrchen wiederholt umgeschüttelt. Darauf wurde zentrifugiert, der Alkohol mittels einer Pasteurschen Pipette entfernt und bis 60° erhitzte, deznormale Salzsaure hinzugefugt. Die Temperatur der Rohrchen wurde weiter auf dem Wasserbade 7 Min. lang auf 60° gehalten, darauf die Röhrchen 2—3 Min. in kaltes Wasser gestellt, wieder zentrifugiert, die Salzsäure mit der Pipette entfernt und Fuchsinschwefelsaure hinzugefugt. Die Fuchsinschwefelsäure wurde nach der Anweisung von Feulgen bereitet. Die Ergebnisse wurden nach Hinzufügen der Fuchsinschwefelsäure im Verlauf der ersten 2 Std. alle 10 Min. registriert. Als Kontrolle dienten Rohrchen mit Mikrobenniederschlag, der nicht hydrolisiert, im übrigen jedoch gleich bearbeitet worden war.

Untersuchungsergebnisse.

Mittels der oben beschriebenen Methodik wurde festgestellt, daß bei allen der Untersuchung unterworfenen, auf Fleisch - Pepton - Agar kultivierten Bakterien die Feulgensche Reaktion in vitro positiv ausfällt. Der Niederschlag in den Zentrifugierröhrchen zeigt meist 15—20 Min. nach Zusatz von Fuchsinschwefelsäure einen violetten Anflug. Während weiterer 20—30 Min. färbt sich der gesamte Niederschlag intensiv violett, während die über dem Niederschlag befindliche Fuchsinschwefelsäure farblos ist. Abb. 1 zeigt gefärbte Niederschläge aus 24std. Kulturen von B. fluorescens liquefaciens, B. prodigiosum und B. tumescens. Hat die Färbung ihr Maximum erreicht, so verändert sie sich beim Aufbewahren der Röhrchen in den folgenden Stunden, sogar in 2 Tagen nicht. Verschiedene Bakterienarten färbten sich nicht immer gleich stark, die Schwankungen waren jedoch unbedeutend und wurden unbeachtet gelassen. In den Kontrollröhrchen, wo die Bakterien nicht hydrolisiert worden waren, trat keine Färbung des Niederschlages ein. In seltenen Fällen ließ sich in den Kontrollröhrchen eine nichtspezifische Reaktion beobachten, die sich von der positiven folgendermaßen unterscheidet:



Abb. 1.

1. Die nichtspezifische Reaktion tritt unmittelbar nach Zusatz der Fuchsinschwefelsäure ein;

2. es färbt sich nicht der gesamte Niederschlag, sondern einige Teile desselben;

3. die Färbung ist nicht violett, sondern leuchtend rot;

4. die Färbung tritt ohne vorherige Hydrolyse ein, nimmt im weiteren Verlauf allmählich ab und verschwindet endlich ganz, während die spezifische Färbung unverändert bleibt. Diese leuchtende Färbung hängt von der Dissoziation der Fuchsinschwefelsäure ab und die Erscheinung hat Ähnlichkeit mit dem von Feulgen beschriebenen „Wassereffekt". Es wäre möglich, daß diese Reaktion mit dem Vorhandensein von Wasser oder Luft im Bakterienniederschlag in Verbindung steht.

Nachdem festgestellt worden war, daß Bakterien positiv reagieren, stellten wir uns die Aufgabe, zu verfolgen, ob ein Verhältnis zwischen dem Alter der Kultur und der Färbungsintensität bestehe. Zu diesem Zweck wurden parallel Niederschläge aus 18—24stünd. und 18—43tägigen Kulturen bearbeitet, es ließ sich jedoch bei den sporenlosen Formen keinerlei Regelmäßigkeit feststellen: Der Niederschlag aus jungen und aus alten Kulturen färbte sich gleichstark. Mit alten Kulturen sporentragender Bakterien verhielt es sich anders: fast ausschließlich aus Sporen bestehender Niederschlag aus alten Kulturen färbt sich schwächer, als aus jungen Zellen bestehender Niederschlag. Diese Erscheinung traf bei allen sporentragenden Bakterien zu. Anscheinend ist die Sporenmembran für die angewandten Reagenzien undurchlässig. Die schwache Färbung des Niederschlages hängt höchstwahrscheinlich von den in den alten Kulturen befindlichen spärlichen, vegetativen Zellen ab.

Stets eintretende Färbung des Bakterienniederschlages konnte nicht als unwiderlegbarer Beweis für die Ansicht gelten, daß Bakterienzellen Tymonukleinsäure enthalten. Es tauchte vielmehr die Frage auf, ob die positive Feulgensche Reaktion der Bakterienniederschläge nicht von Stoffen abhängig sei, die, durch Bakterien dem Nährboden entzogen, zwischen den Zellen sich befinden. Zur Klärung dieser Frage wurden Bakterien auf den oben angeführten synthetischen Nährböden kultiviert und Kulturen verschiedenen Alters wie üblich bearbeitet. Die Ergebnisse stimmten in allen Fällen mit den oben beschriebenen überein. Einige Bakterienarten wiesen auf synthetischen Nährböden sehr langsames Wachstum auf, aus welchem Grunde die Hauptuntersuchungen mit Kulturen auf Fleisch-Pepton-Agar ausgeführt wurden. Bei Nachprüfung der Untersuchungen von Voit (Verf. fand, daß Fleisch-Pepton-Agar positiv nach Feulgen reagiert) erwies es sich, daß entsprechend bearbeitete Stückchen von Fleisch-Pepton-Agar, selbst bei bedeutender Dicke der Stückchen, sich nur schwach violett färben. Dessen ungeachtet schienen uns folgende Versuche geboten: Petrischalen mit Fleisch-Pepton-Agar wurden mittels eines Spatels mit B. ellenbachensis, Proteus vulgaris, B. megatherium und B. prodigiosum geimpft. Jede Bakterienart wurde isoliert auf mehrere Schalen geimpft. Die Schalen wurden 4 Tage lang in den Thermostaten bei 25° gestellt, darauf der Bakterienbelag vorsichtig entfernt, der Agar in Stücke geschnitten und nach Feulgen untersucht. Als Kontrolle diente fester, steriler Agar. Es erwies sich, daß unbenutzter Agar und Agar, auf dem Bakterien kultiviert worden waren, gleichartig reagierten, d. h. sich durchweg blaß violett färbten.

Die Gesamtergebnisse — übereinstimmende Ergebnisse mit Kulturen auf synthetischen Nährböden und auf Fleisch-Pepton-Agar, Versuche mit sterilem und gebrauchtem Agar, schwächere Färbung sporenhaltigen Materials — berechtigen zu der Annahme, daß die Färbung des Niederschlages von Nukleinsäuren, die sich in den Zellen, und nicht außerhalb derselben befinden, abhängt.

Was die Hefezellen anbetrifft, so reagierten alle 4 untersuchten Arten positiv. Die violette Färbung der Hefeniederschläge in den Zentrifugierröhrchen war schwächer als die der Bakterien. Alle Hefearten färbten sich gleich.

Die Niederschläge wurden weiter mikroskopisch untersucht. Ein Teil des Niederschlages wurde aus dem Zentrifugierröhrchen, samt einer geringen Menge der im Röhrchen befindlichen Fuchsinschwefelsäure, auf einen Objektträger gebracht.

Das Präparat wurde mit einem Deckglas bedeckt und gleich untersucht, da sich die Fuchsinschwefelsäure nach einigen Minuten zersetzt und die Zellen diffus rotlich färbt.

Die aus dem gefärbten Niederschlage entnommenen Bakterien waren, mikroskopisch betrachtet, völlig farblos. Weder diffuse Färbung der Zellen, noch gefärbte Körner wurden beobachtet. Diese Beobachtung bezieht sich auf isolierte und in kleinen Gruppen gelegene Bakterien. Größere Bakterienanhäufungen erscheinen mikroskopisch violett gefärbt, mit einem rötlichen Anflug, und zwar sind die Bakterienanhäufungen in ihrer Gesamtmasse gefärbt, während isolierte Zellen farblos sind. Gleiche Ergebnisse wurden mit allen untersuchten Hefearten gewonnen. In keinem einzigen Fall ließen sich gefärbte Kerne beobachten. Ungefärbt blieben bei Hefezellen ferner die Membran, das Zytoplasma, Öltröpfchen und Metachromatin.

Die Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchung veranlaßten uns, zur Kontrolle die Epidermis der Zwiebel (Allium cepa) zu untersuchen. Zwiebelplatten von 2—3 mm Dicke wurden, wie oben beschrieben, bearbeitet und nahmen schwach violette Färbung an. Mikroskopisch erschienen die Kerne violett gefärbt, während das Zytoplasma farblos war.

Folglich fällt bei verschiedenen Bakterienarten und bei Hefe die Feulgensche Reaktion in vitro nur bei Zellen en masse positiv aus. In einzelnen Zellen gelingt es nicht, den Kern der Hefezellen sowie Chromatinkörner und Prosporen bei Bakterien durch eine Methodik festzustellen, mittels welcher das Vorhandensein von Tymonukleinsäure in den Kernen von Allium cepa leicht zu bestimmen ist. Es wurden noch Modifikationen der Bearbeitung des Niederschlages versucht — verlängerte Dauer der Hydrolyse (15 Min.), höhere Temperatur der Salzsäure (bis 75°), Fuchsinsäure, die mittels Durchströmung von SO_2 durch Fuchsinlösung bereitet wurde —, die Untersuchungsergebnisse blieben indes unverändert. Auch in 1—2 Tage aufbewahrten Niederschlägen befanden sich farblose Zellen. Wie aus dem Gesagten ersichtlich, ließen sich bei mikroskopischer Untersuchung von Hefezellen und Bakterien unmittelbar in Fuchsinschwefelsäure keine positiv reagierenden Strukturen feststellen. Da Kerne höherer Pflanzen bei gleichen Bedingungen positiv reagieren, sind die abweichenden Ergebnisse der Reaktion nicht von der Methodik, sondern vom Bestand der untersuchten Objekte abhängig. Es können in dieser Hinsicht folgende Vermutungen ausgesprochen werden. Infolge des geringen Umfangs der Hefekerne und der Chromatinkörner und Prosporen bei Bakterien färben sich dieselben nach der gegebenen

Methodik so schwach, daß die violette Färbung nur bei bedeutenden Anhäufungen der Mikroorganismen wahrnehmbar wird. Ähnlich verhält es sich mit pigmentbildenden Mikroorganismen, deren Kulturen sich gleichfalls stark färbten, während mikroskopisch die Zellen keine diffuse Färbung aufwiesen und keine „Träger" dieser Färbung in Gestalt bestimmter morphologischer Elemente enthielten.

Schlußfolgerungen.

1. Hefe und Bakterien zeigen die positive Feulgensche Reaktion in vitro — der entsprechend bearbeitete Mikroorganismen-Niederschlag färbt sich violett.

2. Auf synthetischen Nährböden und auf Fleisch-Pepton-Agar kultivierte Bakterien nehmen gleiche Färbung an.

3. Bei mikroskopischer Untersuchung von Hefe und Bakterien, die den gefärbten Niederschlag bilden, in einem Tropfen Fuchsinschwefelsäure, erwies es sich, daß nur die Zellanhäufungen gefärbt sind. Einzelne Zellen sind farblos und enthalten keine gefärbten Elemente. In Epidermisstückchen von Allium cepa reagieren die Kerne bei gleicher Bearbeitung positiv.

Literatur.

1. Alexeieff, A., Arch. f. Protistenkde. Bd. 49. 1924. S. 396—432. — 2. Badian, J., Acta Soc. Bot. Polon. Vol. 10. No. 3. 1933. p. 361—378. — 3. Badian, J., Arch. f. Mikrobiol. Bd. 4. H. 3. 1933. S. 409—418. — 4. Cuhna, A., et Muniz, J., Compt. Rend. Soc. Biol. T. 100. 1929. p. 951—954. — 5. Feulgen, R. und Rossenbeck, H., Ztschr. f. Physiol. Chem. Bd. 135. 1924. S. 203 bis 241. — 6. Feulgen, R. und Voit, K., Ebenda, S. 249—252. — 7. Feulgen, R., Abderhald. Handb. d. biol. Arbeitsmeth. Abt. 5. 1926. S. 1071. — 8. Imšenecki, A., Arch. f. Mikrobiol. Bd. 5. H. 4. 1934. S. 451—476. — 9. Jirowock, zit. nach Cuhna und Muniz. — 10. Kuhn, Ph. und Sternberg, K., Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. Bd. 121. 1931. S. 113—161. — 11. Kuzela, zit. nach Pietschmann und Rippel. — 12. Neumann, F., Berlin. tierärztl. Wochenschr. Nr. 7. 1930. S. 101—102. — 13. Poter, H., Compt. Rend. Ac. Sc. Paris. T. 197. No. 1. 1933. p. 88—90. — 14. Poter, H., Ann. Inst. Past. T. 51. 1933. p. 742—760. — 15. Pietschmann, K. und Rippel, A., Arch. f. Mikrobiol. Bd. 3. H. 3. 1931. S. 422. — 16. Pokrowskaja, M., Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 119. 1931. S. 353—361. — 17. Rochlina, E., Bull. Acad. Sc. No. 3. 1933. p. 855—858. (Russ.) — 18. Stapp, C. und Bortels, Ztschr. f. Parasitenkde. Bd. 4. 1931. S. 101. — 19. Thomas, A., Arch. zool. exper. T. 72. 1932. p. 417—443. — 20. Voit, K., Ztschr. f. ges. exper. Med. Bd. 55. 1927. S. 564—568. — Voit, K., Ebenda, S. 569—571. — 22. Wermel, E., Ztschr. f. Zellforsch. u. Mikr. Anat. Bd. 5. 1927. S. 400—414.

Nachdruck verboten.

Studies on the Bacterial-Plant groups.

II. Variations in the Infective Power of the Nodule Bacteria of Cowpea group.

(1) Influence of Light on Infection[1]).

By M. S. Raju.

Bacteriological Assistant, Agricultural Research Institute, Coimbatore (India).

With 5 figures in the text.

Of the eighteen cross-inoculation groups of the nodule bacteria which have been described (3) the organisms of cowpea group show the greatest range of host plants and also a wide range in their cultural characters. The organisms of this bacterial-plant group are known to produce nodules on no less than 23 genera of the Leguminosae. Under these circumstances, it is not surprising to find wide variations in infective power of the nodule bacteria of this group as given below.

During the summer of 1931 it was observed (14) that the laboratory stock culture, cowpea 600, isolated from the nodules of cowpea did not produce nodules on cluster bean (Cyamopsis psoraloides, D. C.) dew gram (Phaseolus aconitifolius, Jacq.) and horse gram (Dolichos biflorus, Linn.) but did produce nodules on green gram (Phaseolus radiatus, Linn.) and related plants. Two other strains of this bacterial-plant group, dew gram 34 and red gram 39, cultures isolated from the nodules of dew gram and red gram (Cajanus indicus, Spreng.) respectively produced nodules on all the plants. The results of these cross-inoculation tests suggest the following:

1. That there is a great variation in the infective power of different strains of nodule bacteria supposed to belong to the same bacterial-plant group.

2. That the nodule production may possibly be influenced by seasonal variations in plant growth, amount of sunlight, etc.

The relation between the deficiency of photo-synthetic activity of the plant and nodule formation has been noted by various workers.

Vines (17), Müller and Stapp (15), Leonard (7), Thornton (16), Eaton (12) and Baldwin and Hofer (1), have all reported that deficiency of light will depress the nodule production. Eaton, however, called attention to an unpublished paper of Rosenfel (13), in which it was found that a long day illumination depressed nodule production in soybeans. This observation is in agreement with some of the preliminary observations of the author and does not agree with those of Eaton. This difference may be reconciled on the assumption that different strains of the nodule bacteria demand different amounts of photo-synthetic material from the host plant in order to produce nodules. With this hypothesis in mind, experiments were undertaken to determine the relation between light and nodule formation. Since the nodule producing capacity of a strain of bacteria also depends upon the variety of host plants, some typical varieties

[1]) Contribution from the Department of Agricultural Bacteriology, University of Wisconsin, U.S.A. and forms part of the thesis submitted towards the partial fulfilment of the Degree of Doctor of Philosophy of the University of Wisconsin.

of plants were chosen in these experiments. A detailed review of the literature relating to this subject was given by Fred, Baldwin and Mc-Coy in their Monograph (loc-cit).

Experimental work.

Since variations in the intensity and in the duration of solar radiation are great at Madison, Wisconsin, during different seasons of the year, it is reasonable to suppose that there will be decided natural differences in the nodule production when plants are grown at different seasons of the year.

Dew gram, horse gram, green gram, and pillipesaru (Phaseolus trilobus, Ait.) were used in the early part of the investigation, and subsequently, red gram (Cajanus indicus, Spreng.) was included. The details of the technique used by the author were given elsewhere (14). A list of the strains of nodule bacteria used in this study is given below:

Culture	Host plant	Remarks
Cowpea 600	Cowpea (Vigna sinensis, Endl.)	U.S. Old 153, Dept. of Agri. 1919
Cowpea 602	Cowpea (Vigna sinensis, Endl.)	A. L. Whiting, 1921
Dew gram 34	Dew gram (Phaseolus aconitifolius, Jacq.)	Coimbatore, India, 1930
Red gram 39 'P'	Red gram (Cajanus indicus, Spreng.)	Coimbatore, India, 1930
Mung 2	Mung bean[3]) (Phaseolus aureus, Roxb.)	Baldwin, Madison, U.S.A. 1926
Mat bean 1	Mat bean[3]) (Phaseolus aconitifolius, Jacq.)	Baldwin, Madison, U.S.A. 1926
Crotalaria 2	Crotalaria anagyroides, H. B.[3])	Baldwin, Madison, U.S.A. 1926
Cowpea I	Cowpea[1]) (Vigna catjang, Walp.)	Madison, U.S.A. 1931
Red gram II 'P'	Red gram[2]) (Cajanus indicus, Spreng.)	Madison, U.S.A. 1931
Red gram I 'P'	Red gram[1]) (Cajanus indicus, Spreng.)	Madison, U.S.A. 1931
Horse gram II	Horse gram[2]) (Dolicus biflorus, Linn.)	Madison, U.S.A. 1931

'P' Passed through the host plant for purification.

[1]) Plants grown in the green house under controlled conditions; used dry land soil from Coimbatore, India, as an inoculatum.

[2]) Plants grown in the green house under controlled condition receiving diffused light (under the bench); used dry land soil from Coimbatore, India, as an inoculum.

[3]) Plants grown at the Hill farm, Madison, Wisconsin (U.S.A.).

A description of the cultures except the last four in the above list was given in the early report. The tests of purity and identity of the remaining four cultures were conducted in the same manner and the results of which were presented in Table 1.

Table 1. Showing the results of the Tests of Purity of the Nodule Bacteria of Cowpea group.

Culture	Litmus milk	Veal broth	Bromthymol blue mannitol agar slant	Cultures	Litmus milk	Veal broth	Bromthymol blue mannitol agar slant
Cowpea I	—	—	A +++	Red gram I	+	—	A +++
Horsegram II	S ++	+	AR +++	Red gram II	S ++	—	A +++

+++ = Heavy growth; ++ = Moderate growth; + = Slight growth; — = No growth or no visible change.

A = alkaline in reaction; R = very slight rough surface; S = narrow serum zone.

All these cultures produced nodules on their respective host plants.

These cultures were quick growing and produced a considerable amount of gum which was not viscous. The slant cultures were broad. The surface of the colonies as well as the slant was moist, shiny and smooth and raised. The culture, horse gram II, differed, however, only in possessing a very slight rough surface. The size of the colonies on yeast water mannitol agar after 7 days of incubation at 30° C. was 5 to 15 mm. in diameter. They were ranging from opaque to translucent.

The cultures showed no growth on potato slants and did not produce any colonies characteristic of radiobacter on glycerol crystal violet agar plates. The culture proved to be pure nodule bacteria of the cowpea group.

Light. A short extract of the meteorological data published by the local office of U.S. Weather Bureau is included. From October to March, the plants received additional illumination from a 200 Watt Mazda lamp without a reflector at a distance of 20 inches from 8 to 9 A. M. and 5 to 8 P. M. daily. On cloudy days the additional illumination was given from 8 A. M. to 8 P. M. During other periods of the year, the condition of light was same as described in the earlier report (14).

Temperature. The condition of the temperature was the same as mentioned in the earlier report (14).

Data on solar-radiation and temperature, Madison, Wis.

1931				1932			
Month.	Mean Temp. ° F	Sun-shine in hours	Solar radiation per sq. cm. in hundreds gram calories	Month.	Mean Temp. ° F	Sun-shine in hours	Solar radiation per sq. cm. in hundreds gram calories
May	54.9	222	130	Jan.	25.9	68	34
June	71.4	264	146	Feb.	27.1	155	65
July	75.8	348	171	March	24.4	172	103
Aug.	70.8	296	139	April	44.6	223	125
Septr.	68.4	236	101	May	58.6	262	147
Octr.	54.9	177	70	June	70.4	326	161
Novr.	44.8	112	41	July	73.7	385	174
Decr.	33.0	83	30	Aug.	71.2	284	132

The solar-radiation was minimum in December, optimum in April and maximum in July.

Variations in the infective power of nodule bacteria of the cowpea group as influenced by the time of the year and the variety of plant.

The results of these tests are presented in Tables 2, 3, 4 and 5.

Same symbols were used in all the following tables (3—7).

All the strains produced nodules in March and April. The solar-radiation was also optimum for the growth of all the plants during these months.

From November to February there was a decline in the production of nodules. The strains of bacteria of low infective power failed to produce nodules on some of the plants. The intensity and the duration of solar-radiation were at their minimum during this season and consequently plant growth was very poor. From May to August, these strains produced either very poor or no nodules. The solar-radiation was high during this period. The plants appeared to be normal in their growth.

Table 2. Showing the variations in nodule production at different seasons of the year.

Planted on	Examined after	Culture Cowpea 600							
		Pillipesara		Dew gram		Green gram		Horse gram	
		Nodules	Plant growth	Nodules	Plant growth	Nodules	Plant growth	Nodules	Plant growth
1931	days								
July 11.	32	+	+++	—	++	+	+++	—	+++
Aug. 24.	32	—	++	—	++			+	+++
Nov. 9.	25	—	+	—	+	++	++	—	+
Dec. 31.	35	—	?	—	+	+	+	—	+
1932									
Feb. 3.	27	—	?	—	+	+	+	—	+
March 11.	27	+	+	+	++	++	++	+	++
April 11.	24	+	+	++	+++	++	++	++	++
May 11.	39	?	+	++	+++	++	++	++	++
June 22.	29	?	+++	+	+++	?	+++	?	+++
Aug. 2.	32	?	+++	+	++	+	+++	—	+++

Nodules. — = no nodules; ? = only very few plants with nodules and many without any; + = very few small nodules; ++ = few nodules; +++ = moderate nodules; ++++ = good nodules on tap root. Plant growth. — = Sickly or etiolated; ? = very slow growth; + = slowgrowth; ++ = moderate growth; +++ = good growth.

Table 3. Showing the variations in nodule production at different seasons of the year.

Planted on	Examined after	Culture Dew gram 34					
		Pillipesara		Dew gram[1]) Green gram		Horse gram	
		Nodules	Plant growth	Nodules	Plant growth	Nodules	Plant growth
1931	days						
July 11.	32	++++	+++	++++	+++	+++	+++
1932							
March 16.	22	++++	+	++++	++	+++	++
April 11.	24	++++	+	++++	+++	+++	+++
May 11.	39	++++	+	++++	+++	++	+++
June 22.	29	++++	+++	++++	+++	++	+++
Aug. 2.	32	+++	+++	++++	+++	++	+++

[1]) Dew gram and green gram behaved alike and hence they were shown in the same column.

Table 4. Showing the variations in nodule production at different seasons of the year.

Planted on	Examined after	Culture Cowpea 602					
		Pillipesara		Dew gram[1]) Horse gram		Green gram	
		Nodules	Plant growth	Nodules	Plant growth	Nodules	Plant growth
1931	days						
Decr. 31.	35	+	?	+++	+	+++	+
1932							
Feb. 3.	28	—	?	+++	++	+++	+
March 11.	27	++	+	++++	++	++++	++
April 11.	24	+++	+	++++	+++	++	+++
June 22.	29	++++	+++	++++	+++	++++	+++

[1]) Dew gram and horse gram behaved alike and hence they were shown in the sam ecolumn.

Table 5. Showing the variation in nodule production at different seasons of the year. Red gram plants.

Planted on	Examined after	Plant growth	Nodule production by	
			Cowpea 600	Dew gram 34
1931	days			
Oct. 21.	33	++	++++	++
1932				
March 11.	43	++	++++	++
May 21.	28	+++	++++	—
June 22.	29	+++	++++	?
Aug. 2.	32	+++	++++	+

The results presented above indicate clearly that there was positive correlation between the solar-radiation, plant growth and the production of nodules, especially by the strains of low infective power. When the solar-radiation was above the optimum required for nodule production, it produced deterrant effect on the nodule production by the weaker strains, although the plant growth was not effected to any marked degree. It did not affect the infective power of the stronger strains. A strain which is highly infective on one variety of host plant need not necessarily be infective to the same degree on other varieties also. As a matter of fact the strains, Cowpea 600 which was poor on all other host plants was highly infective on red gram while the strain Dew gram 34 was highly infective on all other plants and very poor on red gram (Figs. 1 to 5).

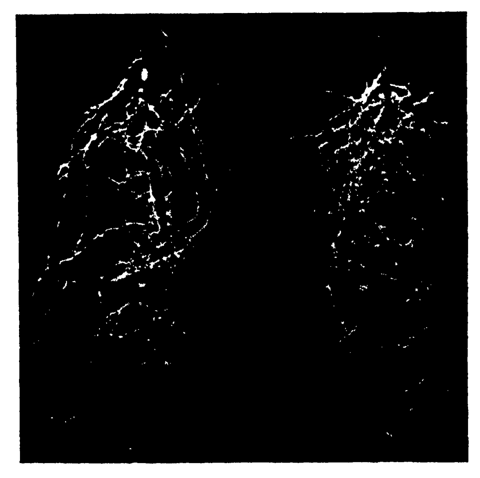


Fig. 1. Production of nodules on green gram plants by different strains of nodule bacteria. Left — Dew gram 34. Right — Cowpea 600. Sown on May 11, 1932. Examined on June 19, 1932.

To extend the scope of application of the above results, five strains of nodule bacteria of the Cowpea group from wide sources were selected for nodule production. The tests were made either late in August or October and early in November or January to represent favourable and deficient conditions of light respectively. The original host plant was used in both the tests for Red gram 39. For the rest of the strains, the first test was made late in summer or beginning of autumn on Cowpea (Vigna catjang, Walp.) and the second test was made during autumn and winter on their original host plants which were supposed to possess high specificity even under deficiency of light. Table 6 shows the results of these tests.

All the strains produced nodules in the first test, but in the second test due to a deficiency of light all except one produced very few or no nodules at all. The infective power of Mat bean was not appreciably affected. The

strain Red gram 39 produced only very poor nodules, while the rest failed to produce any. The magnitude of depression in the nodule production varied with the strain. The plants grew only slowly in the second test.

Table 6. Showing the variations in the nodule production by different cultures of nodule bacteria at different seasons of the year.

Culture	Host plant	Planted on	Examined after	Nodules	Plant growth
			days		
Red gram 39	Red gram (Cajanus indicus, Spreng.)	Oct. 21, 1931	33	+++	+++
	Red gram (Cajanus indicus, Spreng.)	Nov. 8, 1931	26	+	++
Cowpea 1	Cowpea (Vigna catjang, Walp.)	Aug. 24, 1931	21	+++	+++
	Cowpea (Vigna catjang, Walp.)	Nov. 8, 1931	26	—	++
Mung bean 2	Cowpea (Vigna catjang, Walp.)	Aug. 24, 1931	21	+++	+++
	Green gram (Phaseolus radiatus, Linn.)	Nov. 8, 1931	26	—	+
Mat bean 1	Cowpea (Vigna catjang, Walp.)	Aug. 24, 1931	21	+++	+++
	Dew gram (Phaseol. aconitifolius, Jacq.)	Jany. 1, 1932	35	+++	+



Fig. 2. Green gram plants treated with different strains of nodule bacteria. C — control. 1 — Dew gram 34. 2 — Cowpea 600. Sown on May 21, 1932. Photographed on July 19, 1932.

The effect of low intensity ef light on the nodule production.

The object of present experiment was to test the effect of growing leguminous plants under a low and high intensities of solar-radiation on the nodule production. The green gram and the red gram plants were inoculated on May 21, 1932 with cultures Dew gram 34, cowpea 600 and Mat bean 1 according to the technique already referred to. One set of plants from each treatment were grown on the table under a high intensity of light while the other set was grown under the same table receiving only a low intensity of light (diffused light). The other environmental conditions such

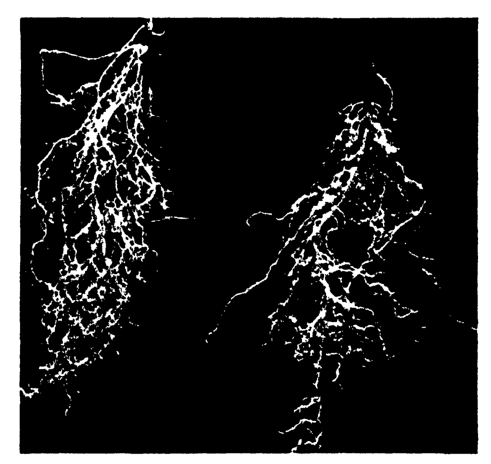
as moisture, temperature etc., were identical in both the sets. The plants were examined for the nodules after 28 days of growth. The results of these tests were given in table 7.

Table 7. Showing the variations in the nodule production at different intensities of light.
Sown on May 21, 1932 and examined for nodule after 28 days.

Culture	Examined after	High light				Low light	
		Green gram		Red gram		Green gram[1]) Red gram	
		Nodules	Plant growth	Nodules	Plant growth	Nodules	Plant growth
	days.						
Dew gram 34	28	+++	+++	-	+++	—	—
Cowpea 600	28	—	+++	++++	+++	—	—
Mat Bean 1	28	++	+++	++	+++	—	—

[1]) Green gram and red gram behave alike, hence they were shown in the same column.

The plant growth was normal in the set which received high intensity of light, whereas the plants which received only low intensity of light were partially etiolated and the second pair of leaves did not appear within the period under observation. The root system of the latter was very short and scanty, unlike the plants grown in the month of January and February when the solar intensity was at its minimum.


Fig. 3. Production of nodules on red gram plants by different strains of nodule bacteria. Left — Dew gram 34. Right — Cowpea 600. Sown on May 11, 1932. Examined on June 19, 1932.

The culture, dew gram 34, produced good nodules on green gram but no nodules on red gram under high intensity of light. The strain cowpea 600, failed to produce nodules on green gram but produced very good nodules on red gram plants. None of the cultures tested here could produce nodules on plants grown under a low intensity of light. These results confirm the previous findings that the intensity of light is a very important factor in the production of nodules. Under the conditions of the experiment the low intensity depressed the nodule production of even the strain with high in fective power. The high intensity of light, under the conditions of the experiment depressed the nodule production of strains with low infective power.

The infective power of a soil as influenced by the intensity of light.

It was observed that when soil from Coimbatore (India) was used as an inoculum, nodules were produced on groundnut (A r a c h i s h y p o -

gaea, Linn.) during the period, September 1 to October 4, 1931, but not during the period, January 1 to February 5, 1932. This soil had for many years produced well nodulated crops of cowpea, groundnut, etc. The results of these experiments underrated the ability of the soil to produce nodules when the light was deficient.

To find out the influence of different intensities of light on the infective power of a soil, the following experiment was carried out. The bacterial free seeds of horse gram, dew gram and red gram were planted in ½ gallon pots of sterile sand to which 10 gm. of garden soil from Coimbatore, India, were added. This soil was also known to produce well nodulated

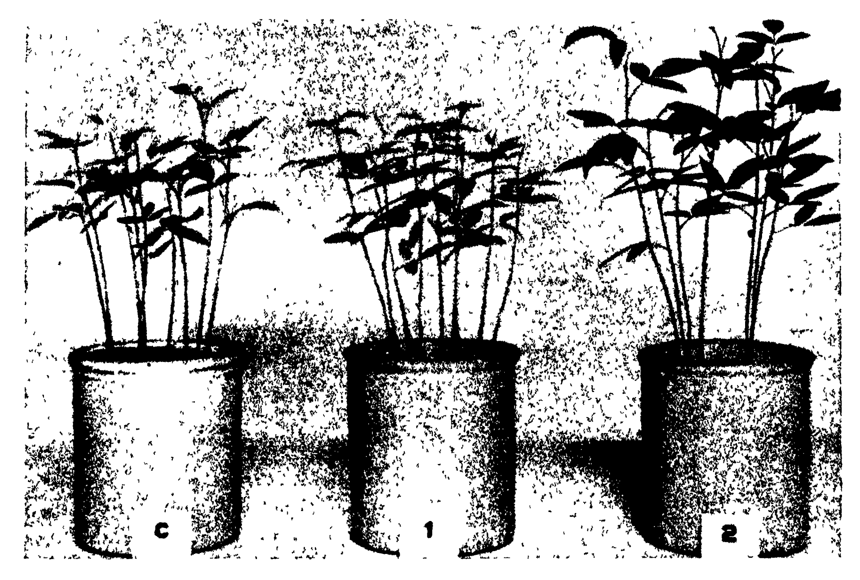


Fig 4. Red gram plants treated with different strains of nodule bacteria. C — control. 1 — Dew gram 34. 2 — Cowpea 600. Sown on May 21, 1932. Photographed on July 19, 1932.

crops of horse gram, red gram, etc., for many years. On April 25, 1932, one set of plants which was placed on the table in the green house received an abundant of light, and served as a control. The other set, which was placed under the table, received only diffused light.

The plants were examined periodically for the nodule production. The final observations were made after 3 weeks of growth. The plants in the control set grew well and produced good nodules. The horse gram and dew gram plants which received the diffused light, failed to produce any nodules, while the red gram plants produced only a few small nodules. They were tall and somewhat spindly with very small leaves. The results of these experiments show that this soil failed to produce nodules, at least on some plants, under the conditions of the experiment when the light was very much reduced.

The influence of direct sunlight on the nodule production and nitrogen fixation.

The external environmental conditions in the greenhouse were not comparable to those in the field since the ultraviolet part of the solar spec-

trum was filtered off by the glass panes. Hence, some tests were repeated on August 2, 1932 to see whether the results could be duplicated outside the greenhouse. The cultures of nodule bacteria, namely, cowpea 600 and dew gram 34 were inoculated on horsegram, pillipesara and red gram. One set was kept in the greenhouse and when the seedlings were a week old the other set was transferred to a nursery box set up outside the greenhouse. The doors of the box were removed except during nights and at rainy times. The plants received direct sunlight from 8—30 A. M. to 5—15 P. M. daily. Controlled conditions were maintained. When the plants were 30 days old, they were examined for the nodule production.

There was no difference in the capacity of the bacteria to produce nodules between the two sets, though there was a great difference in the growth of the plants. The tops of the plants which received direct sunlight were stunted and the roots were long and numerous. The tops showed trophic effect towards light. These observations were in agreement with those of Popp (11). The stems were stiff. In red gram, the tops of the plants were not much stunted. The culture, cowpea 600, failed to produce nodules on horse gram, but produced only very few nodules on a few plants of pillipesara.

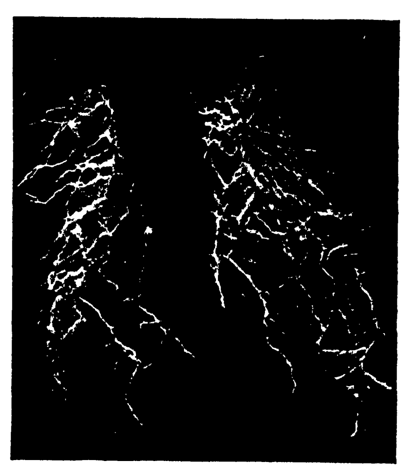


Fig. 5. Production of nodules on horse gram plants by different strains of nodule bacteria. Left — Dew gram 34. Right — Cowpea 600. Sown on May 11, 1932. Examined on June 19, 1932.

Detailed observations were made on the red gram plants for the nodule counts, dry weight and total nitrogen contents of the roots, stems and leaves. The samples were first heated in a steam oven for ½ hour to kill the enzyme activity, then dried for 3 days at 55° C. The final dry weights were taken after drying them in a steam oven for 3 days. The total nitrogen was estimated by modified Kjeldahl's method to include nitrates. Since there was an average of three plants under each treatment, the value of same are given in table 8.

From the results presented in table 8 the following conclusions were arrived at.

1. A good strain like cowpea 600 favoured the root development of red gram plant when grown in the direct sunlight at the expense of leaves.

Even a poor strain like Dew gram 34 increased the total nitrogen of red gram roots under direct sunlight with a corresponding decrease in the nitrogen of the leaves.

2. The ability of both the strains to fix nitrogen was not changed much by the above treatment.

3. Cowpea 600 could produce nearly double the number of nodules on red gram plants when grown in the direct sunlight than in the greenhouse. When the nodules were compared individually, they were less efficient (about ½) in the nitrogen fixation per unit under direct sunlight than in the greenhouse.

Table 8. Nitrogen Assimilation by Red gram as related to nodule bacteria and quality of light.

Treatment	Height of shoots	Height of Roots	No. of Nodules	Roots		Stems		Leaves	
				Dry weight	Total Ni-trogen	Dry weight	Total Ni-trogen	Dry weight	Total Ni-trogen
	Inches	Inches		mg.	mg.	mg.	mg.	mg.	mg.
Plants grown in green house.									
Control	6.5	4.5	—	241.5	4.35	112.2	1.77	241.2	5.37
Dew gram 34	6.0	5.0	21	200.1	2.37	80.4	1.77	174.0	5.46
Cowpea 600	7.5	3.5[1])	45	252.9	5.19	144.6	4.29	340.8	13.29
Plants grown in direct sunlight.									
Control	6.0	5.5	—	225.3	2.85	93.9	1.17	179.4	3.39
Dew gram 34	6.0	5.5	15	244.5	3.78	132.9	1.77	197.1	3.78
Cowpea 600	6.0	14.0	87	336.3	6.96	169.5	3.27	292.8	9.06

[1]) The tips of the bottom roots were broken during washing.

The selection of nodule bacteria of a higher infective power.

The red gram plants produced a few nodules under the diffused light when inoculated with a soil from India while many nodules were produced under an abundance of light. Some pure cultures were isolated from the nodules of both the sets as well as from those of the horse gram plants grown under abundance of light. Their infective power was tested on June 23, 1932, on green gram, pillipesara, cowpea, red gram and horse gram under a high and a low intensities of light. The plants were examined for the nodule production after 30 days of growth.

Observations on the nodule production in the set which received abundant light are given below:

The strain, horse gram II, did not produce any nodules on dew gram. It produced only a few nodules on pillipesara, green gram, cowpea and horse gram.

The strain, red gram I, produced only a very few nodules on dew gram and good nodules on the rest of the plants.

The strain, red gram II, did not produce any nodules on dew gram, but produced good nodules on the other plants.

Observations on the nodule production in the set which received only diffused light are given below:

During a period of 30 days all of the cultures failed to produce nodules regardless of the plant species. Fifteen days later, the strain, red gram I, produced many nodules on red gram and only a few nodules on horse gram.

The strain, red gram II, produced very few nodules on red gram and none on dew gram, green gram and cowpea.

The strain, horse gram II, produced very few nodules on red gram and horse gram, and none on dew gram, green gram and cowpea.

The strains, however, seemed to be in the following descending order of their infective power; red gram I, red gram II and horse gram II. The red gram organisms reported above seem to be more infective than that from horse gram. The inferiority of strains isolated under the diffused light may be due to extreme condition of light.

The principle of Darwin's law of natural selection could be used for the selection of nodule bacteria of higher infective power. The hardy host

plant and the deficient light probably would eliminate the nodule bacteria of lower infective power to produce nodules.

Discussion.

The results presented here show that the nodule production depends mostly upon the following three factors:

(1) The infective power of the strain of nodule bacteria.
(2) The variety of host plant.
(3) The amount of light.

(1) The infective power of the strain of nodule bacteria: The results presented here indicate that all the strains of nodule bacteria of the cowpea group possess wide variations in their nodule producing capacity on any given host plant. The influence of extreme intensities of light on the nodule production depends upon their original infective power.

(2) The variety of plant. The variety of plant is important in measuring the inherent capacity of the strains of bacteria to produce nodules. A particular strain may be good on one variety of host plants but may be bad on other plants. Cowpea 600 is a poor strain on many plants except red gram and cowpea; whereas dew gram 34 is a good strain on many except red gram. The figures numbers 1 to 5 enclosed here show the types of nodules formed by the strains, cowpea 600 and dew gram 34, on green gram and red gram plants and the resultant plant of growth.

(3) The influence of light. The extreme amounts of light prevented the production of nodules when the infective power of the nodule bacteria was low. The nodules were produced throughout the year when inoculated with strains of higher infective power. When the light was deficient, the growth of the plants was poor. In general, there was a reduction in the nodule production in all cases. Several workers suggested that the deficiency of carbohydrates was the limiting factor under a low amount of light. The evidence available so far (12, 9, 15, 17) as well as other observations made by the author (which will be reported shortly) strengthened this view.

As the season advanced from March to May, there was an increase in the solar-radiation. The plant growth also increased likewise. There was also an increased production of the nodules in all cases.

However, in the summer, with a further increase of sunlight, there was either a decrease or no production of nodules by the strains of nodule bacteria of low infective power. The plants appeared to be normal in their growth. The exact mechanism of the depressing effect of an excess of light on the nodule production is unknown. Some suggestions were, however, made here in an attempt to explain this phenomenon. The excess of light probably produced the following changes. An increase in temperature might have increased the respiration of the plant. This in its turn probably reduced the supply of available carbohydrates required for the production of nodules. Jones and Tisdale (5) observed a reduction of the production of nodules in soybeans by either increasing or decreasing the temperature beyond a favourable range. A disturbance of the C : N ratio of the plant by a greater synthesis of the carbohydrates might be one of the factors. Several workers observed an inhibition of the production of nodules in the presence of large amounts of inorganic nitrogenous salts. According to the theory of Kraus and Kraybill (6) C : N ratio governed the formation of fruits in apple trees. An injury to the catalytic system of the plant

to such an extent as to limit the amount of energy supplied by the plant might be one of the limiting factors. Several workers (4, 10, g) showed that an optimum amount of light was necessary to obtain a maximum growth of plants.

Practical Application.

The above observation find the following practical application:

(1) Determination of the infective power of the nodule bacteria. The ability of the strain of bacteria to produce nodules at a definite temperature within a definite time, on suitable host plants, under extremes of light, in the absence of any supply of organic matter, would be a better expression of their infective power. The supply of CO_2 should be adequate.

(2) Determination of the physiological variations among the varieties of plants for the production of nodules by the nodule bacteria of lower infective power under varying amounts of light.

(3) Selection of the nodule bacteria of higher infective power.

Summary.

1. Variations were observed in the infective power of different strains of nodule bacteria in the cowpea group.

2. The infective power of a strain varies with the variety of host plant.

3. If the light under which the plants were grown was beyond a favourable range, the nodule production by the weaker strains was inhibited.

4. A heavy inoculum of a soil from India failed to infect some plants with nodule bacteria when the light was deficient.

5. The ultraviolet rays and rays of shorter wave lengths which were filtered off by the ordinary glass panes of the greenhouse seem to exert very little influence on the infective power of bacteria. They favoured the root development at the expense of leaves.

6. Some of the results indicated the possibility of the selection of strains of nodule bacteria of higher infective power.

Acknowledgments.

The Author wishes to thank Professors E. B. Fred and I. L. Baldwin for the facilities given and for their helpful advice in the course of the work. His thanks are due to Professor W. E. Tottingham for his interest in the work.

Bibliography.

1. Baldwin, I. L., and Hofer, A. W., Journ. Bact. Vol. 23. 1932. p. 66—67. — 2. Eaton, S. V., Bot. Gazette. Vol. 91. 1931. p. 113—143. — 3. Fred, E. B., Baldwin, I. L., and McCoy, E., Univ. Wis. Studies in Sci. No. 5. p. 195—196. — 4. Garner, W. W., and Allard, H. A., Journ. Agric. Res. Vol. 18. 1920. p. 553—606. — 5. Jones, F. R., and Tisdale, W. B., Journ. Agric. Res. Vol. 22. 1921. p. 17—31. — 6. Kraus, E. J., and Kraybill, H. R., Oregon Agric. Exp. Stat. Bull. 149. 1918. — 7. Leonard, L. T., Journ. Amer. Soc. Agron. Vol. 18. 1926. p. 1012—1016. — 8. Nightingale, G. T., Wis. Agric. Exp. Stat. Res. Bull. 74. 1927. — 9. Peirce, G. J., Proc. Calif. Acad. Sci. Ser. 3 (Bot.). Vol. 2. 1902. p. 295—328. — 10. Popp, H. W., Bot. Gazette. Vol. 82. 1926. p. 306—319. — 11. Popp, H. W., Amer. Journ. Bot. Vol. 13. 1926. p. 706—736. — 12. Prazmowski, A., Landw.-Vers.-Stat. Bd. 37. 1890. S. 161—238. — 13. Rosenfel, R., Univ. Wis. Bachelor's Thesis Unpublished Wis. Univ. Library. 1927. — 14. Raju, M. S., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. 1936. Bd. 94. S. 249. — 15. Müller, A., und Stapp, C., Arb. a. d. Biolog. Reichsanstalt f. Land- u. Forstwirtsch. Berlin-Dahlem. Bd. 14. 1925. S. 455—554. — 16. Thornton, H. G., Proc. Roy. Soc. London. Ser. B. Vol. 106. 1930. p. 110—122. — 17. Vines, S. H., Ann. of Botany London. Vol. 2. 1888/89. p. 386—389. — 18. Wilson, J. K., Phytopathology. Vol. 21. 1931. p. 1083—1085.

Referate.

Bücher, Institutsberichte usw.

Oppenheimer, C., Handbuch der Biochemie des Menschen und der Tiere. II. Auflage. Ergänzungswerk III. Band. XXIII + 1162 S. Jena (Gustav Fischer) 1936. Brosch. 84 RM., geb. 90 RM.

Hiermit liegt die Ergänzung zu Band VII—IX des Hauptwerkes vor, und zwar handelt es sich um die Nachträge zu den Hauptteilen: „Gesamtstoffwechsel unter besonderen Bedingungen", „Spezielle Stoffwechsellehre" und „Regulierung der Funktionen", die natürlich weitgehend unterteilt sind und an deren Bearbeitung eine große Zahl Fachwissenschaftler beteiligt ist.

Es muß auch hier wieder anerkannt werden, daß, obwohl solche Ergänzungswerke an Stelle von Neuauflagen nur Teillösungen darstellen, alle Mitarbeiter ihr bestes getan haben, um auf beschränktem Raum in knapper, klarer Form eine möglichst vollkommene Übersicht über die Ergebnisse der neuen Literatur zu bringen.

Aus der Fülle des Gebotenen seien nur einige wenige Abschnitte zitiert, die für die Leser dieser Zeitschrift vielleicht von besonderem Interesse sind wie z. B. „Wasser-, Mineral-, Eiweiß- und Nukleinstoffwechsel, die Kohlehydrate und die Fette im Stoffwechsel, die Regulation der Atmung, Hormone und Vitamine"; im letzteren Abschnitt sind auch die pflanzlichen Wuchsstoffe behandelt.

Eine Empfehlung zur Anschaffung erscheint bei diesem Standardwerk überflüssig. Stapp.

Winkler, H., Handbuch der Milchwirtschaft. Band 3. Milchwirtschaftliche Betriebslehre. 2. Teil. Organisationen der Milchwirtschaft, Handel und Verkehr mit Milch und Molkereiprodukten, Geschichte der Milchwirtschaft. Wien (Julius Springer). 757 S., 153 Abb. Preis geh. 86 RM., geb. 89,80 RM.

Mit dem vorliegenden Band 3, Teil 2 des Handbuchs der Milchwirtschaft ist die Herausgabe dieses Handbuchs abgeschlossen.

Im 1. Abschnitt (v. Altrock, Wiesbaden) wird das Molkereiwesen der milchwirtschaftlich bedeutendsten Länder geschildert.

Der 2. Abschnitt ist der umfangreichste des ganzen Werkes und behandelt die Organisation der Milchwirtschaft und die Mittel zu ihrer Förderung. Er ist folgendermaßen gegliedert. Im 1. Kap. werden Organisationsfragen und -system in der Milchwirtschaft (von Schindler, Berlin) behandelt. Vom bakteriologischen Standpunkt aus sind von Interesse die Fragen der Qualitätsvereinheitlichung auf Grund von Qualitätsbezahlung und gesetzlichen Vorschriften über hygienische Milchgewinnung. In einem besonderen Kapitel wird die Entwicklung der milchwirtschaftlichen Organisation in Deutschland behandelt. Die im 3. Kap. behandelte Frage der Ausbildung von Melk- und Viehpflegepersonal (Reiser, München) hat wiederum Beziehungen zu bakteriologischen Fragen. In einem weiteren Kapitel wird die Ausbildung des Molkereipersonals genauer vom allgemeinen Gesichtspunkt sowohl wie in bezug auf die einzelnen Länder behandelt (H. Roeder, Königsberg). Das 5. Kap. (Riedel, Wangen) schildert die milchwirtschaftlichen Unterrichts-, Versuchs- und Forschungsanstalten in Deutschland und in der übrigen Welt, eine Zusammenstellung, die jedenfalls auch für bakteriologisch interessierte Kreise von größerem Interesse ist. Kap. 6 befaßt sich mit der milchwirtschaftlichen Weltliteratur (v. Altrock, Wiesbaden). Das 7. Kap. bringt spezielle Ausführungen über Qualitätsförderung (Winkler, Wien). Im 8. Kap. bringt Reuter, Berlin, eine willkommene Zusammenstellung der Milchgesetze und Milchregulative mit Berücksichtigung der einzelnen Länder.

Ein Nachtrag behandelt die in Deutschland anerkannten Pasteurisierungsverfahren. Anschließend bespricht Ertl, Wien, die Milchpropaganda in den verschiedensten Staaten.

Der Abschnitt 3 ist dem Handel und Verkehr mit Molkereiprodukten gewidmet (v. Altrock, Wiesbaden, W. Clauß, Berlin und Wittwer, Kempten).

Im Abschnitt 4 bringt Winkler, Wien, eine zusammenfassende Geschichte der Milchwirtschaft, angefangen von den Sumerern bis zur heutigen Zeit. Unterkap. XII behandelt auf 13 S. das Eintreten der Bakteriologie in die Milchwirtschaft. Den Schluß bildet ein Namen- und Sachverzeichnis.

Das Buch ist jedem milchwirtschaftlich Interessierten wärmstens zu empfehlen. Eine straffere Zusammenfassung des Inhalts unter Vermeidung von überflüssigen Wiederholungen wäre für das im übrigen sehr schöne Werk nur von Vorteil gewesen.

K. J. Demeter (München-Weihenstephan).

Fukuda, Yasona, Über die Hydratur der Pflanzen und eine empirische Formel der Verdunstung und Transpiration. Pflanzenforschung, herausgeg. von Prof. Dr. R. Kolkwitz. Heft 19. Jena (Gustav Fischer) 1935. Preis 6.— RM.

Unter Hydratur versteht man nach Walter (1931) das Maß des Wasserzustandes eines Systems. Der Begriff ist in Analogie zu der Temperatur (als Ausdruck des Wärmezustandes) gebildet. Als Maß für die Hydratur gilt die relative Dampfspannung bzw. der osmotische Wert einer Lösung. Reines Wasser, wasserdampfgesättigte Luft oder ein maximal gequollener quellungsfähiger Körper hat die Hydratur 100.

Die Hydratur einer Pflanzenzelle steht in einfacher Beziehung zur Saugkraft; man kann die Saugkraft nach Renner als Hydraturdefizit bezeichnen. Die Saugkraft einer Zelle ist gleich der Saugkraft des Inhalts, vermindert um den elastischen Wanddruck.

In den folgenden Abschnitten werden nun verschiedene Probleme über den osmotischen Druck der Zelle, die Geschwindigkeit des Wasseraustauschs in Pflanzen, die Verdunstung usw. behandelt und die Gesetzmäßigkeiten in Form mathematischer Gleichungen gebracht, in denen die Konstanten empirisch zu ermitteln sind. Die Übereinstimmung der mathematischen Formulierungen mit den in der Natur obwaltenden Verhältnissen wird durch Versuche geprüft, deren Ergebnisse in zahlreichen Tabellen und Kurven wiedergegeben sind.

Das Buch ist nicht leicht zu lesen, namentlich für den nicht mathematisch geschulten Leser. Es gibt aber in exakter Formulierung eine gute Übersicht über manche, auch ökologisch wichtigen Probleme, die mit dem Wasserhaushalt der Pflanzen in Verbindung stehen. H. Bethge (Berlin-Dahlem).

Hering, Martin, Die Blattminen Mittel- und Nord-Europas. Lief. 1. Neubrandenburg, Verlag Gustav Feller, 1935. 8°. 112 S.; 122 Textfig. Subskriptionspreis: 12 RM.

In der Gallenkunde (Cecidologie) ist es bereits üblich, den Gallenerreger nach der von ihm erzeugten Galle zu bestimmen. In der Minenkunde (Hyponomologie) war die Bestimmung des Minenerzeugers oft unmöglich oder erforderte die meist schwierige Aufzucht des Insekts. Nur wenige Minen von wirtschaftlicher Bedeutung waren allgemein bekannt. Durch das vorliegende Werk wird nun auch die Bestimmung des Minierers durch die von ihm erzeugte Mine ermöglicht. Die Bestimmungstabellen sind — ähnlich wie in den bekannten Gallenwerken — alphabetisch nach den Wirtspflanzen geordnet (vorliegende Lieferung: Abies — Bromus). Zahlreiche Abbildungen sowie biologische und morphologische Angaben für jede Insektenart gestatten

eine sichere Bestimmung. In der Einleitung (S. 1—23) werden in neun kurzen Abschnitten diejenigen Fragen der Minenkunde behandelt, deren Kenntnis für die Benutzung des Bestimmungswerkes unbedingt nötig ist. Außerdem werden vorläufige Beschreibungen von drei neuen Phytomyza- und zwei neuen Tenthrediniden-Arten gegeben.

Das Werk ist nicht nur für die allgemeine Entomologie und Faunistik von großer Bedeutung, sondern besonders auch für die angewandte Entomologie, da die Larven vieler Schädlinge minieren. Dr. Tomaszewski.

Morphologie, Physiologie und Systematik der Mikroorganismen; Virusuntersuchungen.

Roberg, M., Beiträge zur Biologie von Azotobakter. I. Über die Frage der Filtrierbarkeit von Azotobakter. (Jahrb. f. wiss. Bot. Bd. 82. 1935. H. 1. S. 1—30.)

Wiederum ist bewiesen worden, daß die Annahme, alle Bakterien durchlaufen einen Lebenskreislauf mit filtrierbaren, ultravisiblen Stadien, durchaus nicht verallgemeinert werden kann. Es wird die Frage behandelt, ob Azotobakter „Gonidien“ (Fortpflanzungszellen) ausbildet, die bakteriendichte Filter zu passieren vermögen, wie es von einigen Verff. berichtet wird. Die Filtrate wurden mit Azotobakter-Amylobakter-Rohkulturen und mit Reinkulturen von Azotobacter chroococcum, A. agile und A. Beijerinckii vorgenommen. Erstere zeigten keine filtrierbaren Stadien von Azotobakter und Amylobakter, und letztere ließen ebenfalls keine filtrierbaren (Maximalporengröße: 0,3—0,75 μ) Vermehrungskörper erkennen, aus denen sich auf Nähragar normale Zellen hätten bilden können. Bei Maximalporengröße von 1,5 μ passierten gegen 13% und bei 3 μ gegen 23% Azotobakterkeime die Filter. Die durchgeschlüpften Zellen wurden als normale Azotobakterzellen angesprochen. Für die in Azotobakterkulturen massenweise auftretenden kleinen Körnchen konnte der Nachweis, daß es sich hierbei um „Gonidien“ handelt, nicht erbracht werden.

Bärner (Berlin-Dahlem).

Israilsky, W., Pleomorphismus bei den Knöllchenbakterien. (Arbeiten d. Allrussischen Instituts f. landwirtschaftl. Mikrobiologie. Bd. 5. 1933. S. 67—82.) [Russ.]

Die Arbeit beschäftigt sich mit dem Studium verschiedener Rassen der Knöllchenbakterien. Bei der Wicke, Luzerne, Steinklee und Esparsette werden glatte und faltige Kolonien unterschieden. Die ersteren zeigen bei der Zuckervergärung größere Aktivität als die zweiten. Bei manchen Knöllchenbakterien (bei Soja u. a.) fand man filtrierbare Formen. Die Kolonien dieser Bakterien zeigen sehr langsames Wachstum.

M. Gordienko (Berlin-Schöneberg).

Kotek, F., Studien an Bacterium coli. (A. Soc. Bot. Pol. Vol. 10. 1933. p. 537—554.)

Die Frage nach der Herkunft eines jeweils vorkommenden Colonbazillus ist für die Hygiene von außerordentlicher Bedeutung. Da heute immer noch widersprechende Resultate mit den verschiedensten Methoden zur Bestimmung der Herkunft und zur Unterscheidung des Bac. coli vom Bac. aërogenes bei den einzelnen Untersuchern erreicht werden, unterzieht Verf. die Methoden einer genauen Prüfung auf ihre Eignung und Zuverlässigkeit. Nach den bisher gemachten Erfahrungen wird man immer

mehr zu der Überzeugung geleitet, daß alle Bac. coli-Stämme einer Gruppe angehören. Die Methode der Komplementbindung versagt ebenso wie die der Hämolyse, das Verhalten gegenüber verschiedenen H-Ionenkonzentrationen ist ebenso unbrauchbar wie die Inkonstanz des Verhältnisses der Gärungsgase $CO_2 : H_2$. Eine gewisse Abhängigkeit scheint bei der Zusammensetzung der Gase von der Lebensdauer einer Kultur zu bestehen, ob frisch isoliert oder mehrfach übergeimpft. Die Frage der Beeinflussung des Bac. coli durch andere Bakterien wurde ebenfalls geprüft: Bei Gegenwart von Bac. proteus entwickelt sich dieser nicht gut auf demselben Nährboden, weil die Säurebildung stört. Erst wenn Bac. proteus zuerst angesiedelt wird, gedeihen beide nebeneinander. Die Säurebildung des Bac. coli geht unvermindert weiter, jedoch ist die Gasbildung in diesem Falle abfallend. In Mischkultur mit Milchsäurebakterien tritt erhöhte Säurebildung auf, die Gasbildung ist wieder rückläufig. — Aus den Versuchen geht hervor, daß keine der bis heute bekannten Methoden imstande ist, eindeutig die Frage nach der Herkunft des Bac. coli zu entscheiden. In Mischkulturen hält Bac. coli die Oberhand.

Skallau (Berlin).

Kempner, W., Wirkung von Blausäure und Kohlenoxyd auf die Buttersäuregärung. (Biochem. Z. Bd. 257. 1933. S. 41—56.)

Untersuchungen an Clostridium butyricum haben ergeben, daß die Buttersäuregärung durch Blausäure in demselben Maße gehemmt wird wie die Atmung, also wesentlich empfindlicher ist gegen Blausäure als die alkoholische Gärung und die Milchsäuregärung. Danach war anzunehmen, daß sich das Ferment der Buttersäuregärung auch gegenüber Kohlenoxyd anders verhalten würde als die Fermente der alkoholischen Gärung und der Milchsäuregärung. Die Versuche ergaben tatsächlich, daß die Buttersäuregärung ebenso wie die Atmung bei Gegenwart von Kohlenoxyd aufhört und nach Entfernung des Kohlenoxyds wieder beginnt, daß also dieses Gärungsferment ebenso wie das Atmungsferment eine reversible Verbindung mit Kohlenoxyd eingeht. Das Ferment der Buttersäuregärung ist also ebenso wie das Atmungsferment eine Schwermetallverbindung, die Buttersäuregärung eine Schwermetallkatalyse. R. Koch (Berlin).

Schneider, E., Über das Bakteriochlorophyll der Purpurbakterien. II. Mitteilung. Beiträge zur Physiologie der Farbstoffe der Purpurbakterien. (Ztschr. f. physiol. Chem. Bd. 226. 1934. S. 221—254.)

Das Pigment der Purpurbakterien hat sich bei der chemischen Untersuchung als verwandt mit dem Chlorophyll erwiesen, obwohl beide Stoffe sehr verschiedene Spektren zeigen. Das Bakterienpigment ist demnach nicht als Bakteriochlorin, wie bisher, sondern als Bakteriochlorophyll zu bezeichnen. Dieser Farbstoff kommt (wie das Blattgrün) in zwei Modifikationen a und b vor, von denen die letztere infolge ihres starken Vorherrschens näher untersucht werden konnte. Das Bakteriochlorophyll b besitzt die gleiche Elementarzusammensetzung wie das Chlorophyll b, ist aber im übrigen von ihm verschieden. Erst bei weitgehendem Abbau des Bakteriochlorophylls gelangt man zu Produkten, die vom Chlorophyllabbau her bekannt sind. Das Bakteriochlorophyll zeigt eine sehr ausgeprägte Labilität gegenüber schwachen Oxydations- bzw. Reduktionsmitteln. R. Koch (Berlin).

Korssakowa, M. und **Nikitin, E.**, Die Zersetzung der Pektinstoffe durch Mikroorganismen. (Arbeiten d. Allrussischen Instituts f. landwirtschaftl. Mikrobiologie. Bd. 5. 1933. S. 37—51.) [Russ.]

Die Zersetzung der Pektinstoffe geschieht im ersten Stadium durch ihre Hydrolyse in Araban und Pektinsäure, wobei sich bei der Hydrolyse hauptsächlich Granulobakter pektinoforum, B. asterosporus und Schimmelpilze beteiligen. Bac. mesentericus und Bac. subtilis wirken viel schwächer; Bac. amylobakter hat keine hydrolysierende Wirkung. Die Produkte der ersten Hydrolyse (Araban und Pektinsäure) können noch weiter hydrolysiert werden usw.

M. Gordienko (Berlin-Schöneberg).

Nielsen, N., Untersuchungen über die Fähigkeit der Hefe, hoch- und niedrigmolekulare Stickstoffverbindungen zu assimilieren. (Compt. rend. Carlsb. Sér. physiol. Vol. 21. 1935. p. 139—150.)

Die Trennung in hoch- und niedrigmolekulare N-Verbindungen wurde mittels Dialyse vorgenommen, Fällungsmethoden versagten. Trotzdem die benutzten Kollodiumhülsen keine einheitliche Porengröße aufwiesen und dementsprechend auch die N-Gehalte bei den einzelnen Versuchen im Innenmedium sowohl wie im Außenmedium beträchtlich schwankten, konnte doch festgestellt werden, daß im allgemeinen die Hefe die niedrigmolekularen Verbindungen bevorzugt. So enthielt z. B. in einem Falle die filtrierte Pilsnerwürze (10,7%) an assimilierbarem N 54%, nach der Dialyse waren in der Hülse nur noch 3% des Gesamt-N assimilierbar. Bestätigt wurden diese Zahlen durch die Tanninkontrolle, in der Würze betrug der Gehalt an N, der durch Tannin fällbar war, durchschnittlich 20%, nach der Dialyse stieg er teilweise bis auf 90% in der Innenflüssigkeit. Skallau (Berlin).

Halden, W., Zur Kenntnis des Fett- und Lipoidstoffwechsels der Hefen. 3. Mitteilung. Sterin- und Fettanreicherung in untergäriger Brauereihefe. (Ztschr. f. physiol. Chem. Bd. 225. 1934. S. 249—272.)

Die Steigerung des Lipoidgehaltes untergäriger Bierhefe vom Typus Frohberg erfolgt unter Bedingungen, wie sie auch für die Fettanreicherung in Hefen seit langem bekannt sind. Die Belüftung der Hefe mit alkoholhaltiger Luft fördert die Fett- und Lipoidbildung besonders dann, wenn der Wassergehalt der in flacher Schicht auf Agar aufgetragenen Hefe unter 85% gesunken ist. Der Gesamtlipoidgehalt der Hefekulturen kann so auf den 20 fachen, der Steringehalt auf den 60 fachen Betrag gesteigert werden. Der Ergosterinanteil der Steringemische aus untergäriger Bierhefe lag im Mittel bei 80%. Eine Parallelität der Fett- und Sterinbildung war unter den genannten Bedingungen festzustellen. Das p_H sank in den Agarkulturen innerhalb weniger Tage bis auf etwa 4,0. Der Glykogengehalt der Hefe blieb konstant. Im Agarnährboden wurde Acetylmethylcarbinol (Acetoin) angereichert. R. Koch (Berlin).

Sobotka, M., Halden, W. und **Bilger, F.**, Zur Kenntnis des Fett- und Lipoidstoffwechsels der Hefen. 4. Mitteilung. Der Vorgang der Sterin- und Fettanreicherung in untergäriger Brauereihefe. (Ztschr. f. physiol. Chem. Bd. 234. 1935. S. 1—20.)

Der Vorgang der Lipoidanreicherung in Hefen wurde eingehend studiert. Dabei ergab sich eindeutig, daß die Vorbedingung für die Fett- und Sterinanreicherung in der Hefe ein gewisser Wasserentzug ist (vgl. 3. Mittlg.). Außerdem ist eine Behandlung der Hefe mit Alkoholdampf bei mäßiger Lüftung von Wichtigkeit. Auf glukosehaltigem Agar befindliche Hefe bildet reichlichere Mengen an Fett und Lipoiden, als auf nährstofflosem Agar gezüchtete Hefe. Offenbar wirkt auch hier der auf zuckerhaltigem Nährboden gebildete Alkohol günstig im Sinne der Lipoidanreicherung. Diese Ergebnisse decken sich vollkommen mit älteren Angaben besonders von P. Lindner, H. Haehn und anderen. Der Stickstoffhaushalt der Hefen scheint von dem Vorgang der Lipoidanreicherung offenbar unabhängig zu sein.

R. Koch (Berlin).

Winge, Ö., On haplophase and diplophase in some Saccharomycetes. (Compt. rend. Sér. physiol. Vol. 21. 1935. p. 77—112.)

Die frühere Ansicht von Guilliermond u. a., wonach die haploiden Asci parthenogenetisch entstehen, wird durch die Versuche des Verf.s an Saccharomyces ellipsoideus f. Johannisberg II, S. ellipsoideus, S. validus, S. Marchalianus widerlegt. Zwillingszygotenbildung kommt häufig vor. Neben der paarweisen Sporenkonjugation keimen auch ältere Sporen der haploiden vegetativen Phase. Diese Zellen verschmelzen zu 8-förmigen Zygoten, die sofort diploid sprossen. Der Übergang der Haploid- zur Diploidphase erfolgt sehr unregelmäßig. Es können zwei vegetative Schwesterzellen miteinander konjugieren, oder Mutter- mit Tochterzelle usw. Zeitweilig vereinigen sich zwei Sporen vor oder nach ihrer Keimung, auch die Vereinigung vegetativer Zellen mit Sporen kommt vor. Einzige Bedingung ist scheinbar, daß die konjugierenden Zellen ausgewachsen sind. Solche mit kleinem Sproß konjugieren ebenfalls nicht. Phänotypische und genotypische, wie auch + und — Unterscheidung der sich paarenden Zellen sind nicht zu machen. Mit dem Micromanipulator isolierte Einzelsporen aus Asci bilden auf Gipsplatten wieder normale Kulturen mit Asci und Sporen. Bei der Keimung der Einzelspore entwickelt sich die haploide Kolonie nicht sonderlich, erst wenn Zellverschmelzungen zustande gekommen sind, findet üppiges Wachstum statt. Die Zellverschmelzungen bei der Zygotenbildung müssen auch eine Kernverschmelzung im Gefolge haben, die allerdings nicht direkt beobachtet werden konnte. Der Befruchtungsvorgang scheint auf die Hefe einen belebenden Einfluß auszuüben: Zelle und Wachstumsenergie werden größer.

Skallau (Berlin).

Plewako, E. und Tscheban, M., Biologische Beobachtungen über Pentose verwertende Hefepilze. (Microbiology. Vol. 4. 1935. p. 86—95.) [Russisch.]

Unter Hefepilzen, die von Algen des Murmanstrandes isoliert wurden, befanden sich zwei Arten, die die Fähigkeit besaßen, Pentose zu verwerten. Die eine derselben bildet auf flüssigen Nährböden ein aus langen Myzelfäden gebildetes Häutchen und einen Bodensatz von hefeähnlichen, sprossenbildenden Zellen. Verff. benannten den Pilz Monilia murmanica. Der andere Pilz, Oidium laminaria, bildet ein dickes Häutchen und sein Myzel zerfällt in Oidien. Die Versuche der Xyloseverwertung durch diese Pilze wurden auf Hefewasser mit Zusatz verschiedener Mengen Xylose ausgeführt. Die wesentlichsten Ergebnisse der Arbeit sind folgende: 1. Am

besten verwerten die Pilze Xylose in 1 proz. Lösung, bei stärkerer Zuckerkonzentration sinkt der Prozentsatz der Auswertbarkeit. 2. Optimal für das Wachstum der Pilze ist p_H 5,5—6,0. 3. In durchlüfteten Kulturen vermag die Monilia murmanica bis 100 proz. Xylose zu verwerten, unter anaeroben Bedingungen bis 57%. 4. Bei der Zersetzung der Xylose bilden sich Milch- und Essigsäure, Alkohol und Spuren von Glyzerin. 5. Außer Pentosen vermag Monilia murmanica Glukose, Lävulose, Saccharose, Laktose und Maltose zu verwerten. Letztere unter Alkoholbildung (bis 5,85%). 6. Kultivieren der Pilze auf Hydrolysaten von Maiskolben und Stroh, mit einem Xylosegehalt von 7—8% und Durchlüften mittels eines Kompressors ergab sehr ausgiebige Hefemassen. Diese Methode ist zur Gewinnung von Futterhefe anwendbar. A. Imšenecki (Moskau).

Dickson, H., Studies in Coprinus sphaerosporus, II. The Inheritance of Various Morphological and Physiological Characters. (Ann. Bot. Vol. 49. p. 181—204. 1935.)

Im Anschluß an frühere Untersuchungen über Coprinus sphaerosporus studierte Verf. die Vererbung einiger morphologischer und physiologischer Merkmale bei verschiedenen diploiden und haploiden Stämmen. Im Verlaufe von zwei Jahren konnte er beobachten, daß sowohl bei den reinen Diplonten, wie bei denjenigen, die durch Verbindung von Haplonten aus A hervorgegangen waren, wie auch bei den verschiedensten Haplonten von B und C die Ausbildung der Fruchtkörper immer mehr unterblieb bzw. diese steril blieben. Die zahlreichen vorgenommenen Kreuzungsversuche (Verf. hatte 8000 Kulturen verarbeitet) ergaben, daß ein Haplont diploid werden kann durch einen Diplonten, der aus zwei verschiedenen Haplonten entstanden ist. Er ist in allen Fällen fertil. Werden die reifen Sporen innerhalb der nächsten auf die Reifezeit folgenden 24 Stunden ausgesät, so keimen sie fast alle, jedoch wächst nur ein Teil zu normalen Kolonien heran. Der Rest weist Zwergwuchs auf, kaum 1 mm groß. Diese letzten Formen ähneln denjenigen, die man durch Bestrahlung einer Askosporenkolonie von Chaetomium cochliodes mit Röntgenlicht erhält. Verf. hat die verschiedensten Kreuzungen mit Abkömmlingen diploider Myzelien gemacht und auf Grund der gemessenen Wachstumsgeschwindigkeiten 28 Typen aufgestellt, die im einzelnen beschrieben werden. Beim Vergleich der erhaltenen Formen hat er nicht ein Paar gefunden, das vollkommen identisch war, obwohl die Wachstumskurven sich oft sehr ähnlich waren. Die langwährende Reinkultur verändert den morphologischen Bau des Pilzes, nur der Genotyp bleibt unverändert. Skallau (Berlin).

Smith, A. H., and Brodie, H. J., Cultural characters and pairing reactions of monosporous mycelia and development of the fruit body of Pholiota (Flammula) polychroa. (Bot. Gaz. Vol. 96. 1934/35. p. 533—546.)

Das Untersuchungsmaterial stammte von Eichenstümpfen aus Ann Arbor (Michigan). Die Sporen sahen dunkelbraun aus, hatten eine durchschnittliche Größe von 6—7,5 × 3—4 μ. Sie konnten auf verschiedenen Nährböden (Malzextraktagar u. ä.) innerhalb 12 Std. zum Keimen gebracht werden. Die zweikernige Spore besitzt eine Keimpore, durch die das Plasma bei der Keimung hindurchgeht, um außerhalb ein Bläschen zu bilden. In dieses wandern die beiden Kerne. Nachfolgende Kernteilungen finden immer gleichzeitig statt, Verff. beobachteten dies bis zur Bildung von 16 Kernen. Das Myzel bleibt hierbei unverzweigt. Die Basidiosporenbildung

geht in der normalen Weise vor sich. Aus der Tatsache, daß nach der Sporenbildung in der Basidie kein Kern mehr vorhanden ist, in der Spore jedoch 2 Kerne sichtbar werden, schließen Verff., daß in der letzten nochmals eine Kernteilung statthat. Das sich aus einer Basidiospore entwickelnde Myzel ist haploid und bildet reichlich Oidien aus eigentümlich spiralig gedrehten Hyphen. Bei der Paarung von 30 einsporigen Myzelien untereinander traten auch diploide Myzelien auf. Der Diplont überwucherte den Haplonten, er war flaumig im Gegensatz zum dichten, festen Haplonten, so daß er schon makroskopisch von ihm zu unterscheiden war. Ph. pol. ist heterothallisch und tetrapolar. Die meisten Versuche, Fruchtkörper vom Diplonten zu ziehen, schlugen fehl. Nur in einem Falle gelang dies mit Etters Nährmedium. Die Entwicklung des Hutes wird eingehend beschrieben. Sie ist vom Agaricaceentyp in vieler Hinsicht identisch mit der von Ph. flammans und Ph. adiposa. Die taxonomische Stellung des hier beschriebenen Pilzes ist nicht immer eindeutig in der Literatur, man findet ihn unter den Namen Agaricus polychrous Berk, Ag. ornellus Pk., Flammula polychroa Sacc., Pholiota appendiculata Pk., Ph. ornella Pk., Gymnophilus polychrous Berk. Da jedoch die Art der Entwicklung des Pilzes und seine Morphologie, insbesondere die Ausbildung eines deutlichen Velums mehr für die Gattung Pholiota als für Flammula sprechen, schlagen Verff. vor, den hier beschriebenen Pilz Pholiota polychroa (Berk.) comb. nov. zu nennen.

Skallau (Berlin).

Jones, S. G., The Structure of Lophodermium pinastri (Schrad.) Chev. (Ann. Bot. Vol. 49. 1935. p. 699—728.)

Die Keimung der Anfang Mai gesammelten in einer gelatinösen Scheide steckenden Askosporen erfolgt am stumpfen Ende, die Scheide wird durchbrochen unter Bildung einer Ausstülpung, in der mehrere Kerne zu beobachten sind. Ende Juni wird die erste Infektion sichtbar, begünstigt durch Bodenaufwinde. Die ausgekeimten Hyphen gehen durch die Stomata langsam ins Mesophyll, das sehr schnell ohne Zuhilfenahme von Haustorien interzellular zerstört wird. Dabei werden die Zellwände nicht aufgelöst, sie erscheinen z. T. geschwollen und sind durch eine schwarze, körnige Masse pigmentiert. Unter Veränderung der Mittellamelle wird die Endodermis durchdrungen, der Casparische Streifen stellt für den Pilz offenbar ein großes Hemmnis dar. In der Stele geht der Weg der Hyphen dann direkt zum Phloem. Xylemtracheiden werden nicht angegriffen. Verf. konnte auch den von einigen anderen beobachteten schwarzen Ring feststellen, der bis zur Endodermis im Blattquerschnitt durchgeht. Spermogonien und Apothezien werden direkt unter der Epidermis angelegt. Die ersten sind dunkel, oval und von der Natur der Acervuli. Ihre sehr kleinen Kerne sind besser organisiert als die des vegetativen Myzels. Kernteilungen konnten nicht beobachtet werden, sie sind jedoch wahrscheinlich. In einigen Spermogonien sind abweichende Bildungen zu sehen: Karpogone mit aufsitzender Trichogyne. Möglicherweise findet Befruchtung mit benachbarten Spermatien statt, so daß hier ein ähnlicher Fall vorliegt wie bei Flechten, einigen Rhodophyceen und Uredineen. Die Apothezien sind sehr klein, 0,5 × 1 mm, elliptisch und dunkel. Sie tauchen zwischen den schwarzen Ringen auf, teils allein, teils mit Spermogonien vergesellschaftet. Ihre Anlage geschieht noch während das Blatt am Sproß sitzt, von den Spermogonien sind sie schwer zu unterscheiden. Oft treten sie an der Stelle ehemaliger Spermogonien auf, manchmal auch selbständig. Ihre Entwicklung geschieht wie bei typischen Diskomyzeten, echte Periphysen sind vorhanden. Die Anlage der Primordien der Apothezien fällt zeitlich mit der Besitzergreifung des Phloems durch den Pilz zusammen. Mit der Bildung der askogonen Zellen in den jungen Apothezien fallen die Blätter ab. Bis hierher bleibt das Myzel wahrscheinlich haploid. Charakteristisch ist die Ausbildung eines großen Epitheziums.

Skallau (Berlin).

Hiratsuka, N., Phragmidium of Japan. (Jap. J. Bot. Vol. 7. 1935. p. 227—300.)

Verf. hat in ganz Japan 600 Arten aufgelesen, von denen 26 beschrieben werden. Auf Grund der Morphologie und des Verhaltens bei der Keimung der Teleutosporen sind 3 Gruppen aufgestellt: Sect. Euphragmidium Arthur, Sect. Earlea Arthur und Sect. Phragmotelium Sydow. Die meisten angeführten Rostpilze kommen auf verschiedenen Rosenarten vor, eine ganze Reihe auch auf Potentilla-Arten, nur wenige auf andern Rosaceen. Skallau (Berlin).

Enzymologie und Bakteriophagie.

Yamagutchi, S., Untersuchungen über die intrazelluläre Indophenolreaktion bei Bakterien. (Act. Phytochim. Vol. 8. 1935. p. 263—284.)

Die Indophenolase kommt in Bakterien, Hefen, pflanzlichen und tierischen Geweben vor, wo sie sich in inniger Verbindung mit dem Zellplasma befindet. Das aus dem Preßsaft von Lactarius piperatus und L. deliciosus von Shibata und Tamiya dargestellte Enzym soll nach Keilin für die normale Zellatmung unentbehrlich sein, da dieser einen auffallenden Parallelismus zwischen Indophenolase, Atmungsintensität und dem Vorkommen von Cytochrom beobachtete. Von 24 untersuchten Bakterien reagierten 15 negativ auf das Nadi-Reagens, u. a. Micrococcus-, Sarcina-, Coli-, Staphylococcus-Arten. Auch Erwärmen und Zugabe von Äthylurethan zur Zerstörung der Dehydrasewirkung waren ergebnislos. Zu den 9 Nadi-positiven Arten gehörten u. a. Microc. ochraceus, Bac. pyocyan., fluoresc., mesent. HCN schwächte in 10^{-6} bis 10^{-5} molarer Konzentration die Indophenolasereaktion erheblich, bei 10^{-4} blieb sie ganz aus. Das geschah auch in dem Falle, wo bei bestimmten Bakterien die O-Atmung durch HCN nicht geschädigt wird. CO dagegen beeinträchtigt die Nadireaktion nur bei solchen Bakterien, die auch Hemmung der O-Atmung erleiden. Auf eine Erwärmung auf 52° C und Narkotisierung reagierten die Bakterien ganz verschieden: Bac. myc. und Bact. xylin. z. B. verstärkten bei Zugabe von Äthylurethan ihre Nadireaktion. — Im Warburg-Manometer wurde dann die O_2-Aufnahme verfolgt: Die oxydasepositiven Bakterien hatten bei Zugabe von p-Phenylendiamin bzw. Dimethyl-p-phenylendiamin einen erhöhten O_2-Verbrauch, der mit der Stärke der Nadireaktion parallel ging. Allerdings verläuft er nicht linear wie bei der Glukose-Atmung, sondern er nimmt mit der Zeit ab. Bei B. coli u. a. ist sie durch den Ph-Zusatz gehemmt. HCN (10^{-5} molar) setzte die Atmungstätigkeit bei auf 52° C vorerwärmten Bakterien meist schon um 50% herab, die „Zwischenkatalyse" wird offenbar gestört; frische Zellen vertragen die 100 fache Dosis. Versuche mit Zugabe von CO im Manometer (immer in Gegenwart von p-Ph. bzw. Dimethyl-p-Ph.) zeigen ein Parallelgehen des O_2-Verbrauches mit der Indophenolbildung. Die bei einigen Bakterien auftretende Hemmung kann durch Belichtung wieder teilweise rückgängig gemacht werden. Indophenolasefreie Bakterien verbrauchen im normalen Stoffwechsel den O_2 ebenso stark wie diejenigen mit der Oxydase, diese ist daher wohl für die charakteristische O-Atmung entbehrlich. Allerdings muß auf Grund der bestehenden Tatsache, daß fast alle Indophenolase führende Bakterien auch Cytochrom c besitzen, angenommen werden, daß ein noch unbekannter physiologischer Zusammenhang zwischen beiden

Stoffen besteht. Die CO-Hemmung der Atmung (Oxydation von p-Ph. bzw. Dimethyl-p-Ph.) ist nach Ansicht des Verf.s nicht, wie Keilin dies tat, auf eine Vergiftung der Indophenolase zurückzuführen. Das geht daraus hervor, daß bei Escherichia-, Proteus- und Staphylococcus-Arten keine Indophenolasereaktion festzustellen war. Skallau (Berlin).

Popowa, E., Zur Gewinnung eines Pektinasepräparates aus Botrytis cinerea, zur Klärung von Fruchtsäften. (Microbiology. Vol. 4. 1935. p. 247—253.) [Russisch.]

Pektinase wurde aus 4 Pilzen gewonnen: Botrytis cinerea, Aspergillus niger, Asp. Oryzae und Penicillium glaucum. Das wirksamste Ferment lieferte Botrytis cinerea. Zu Pektinasegewinnung wird der Pilz auf dem Nährboden von Roulin kultiviert. Das Myzel 5—7 tägiger Kulturen wird getrocknet und zu Pulver zerrieben. Zu 1,0 Pulver wurden 10 ccm Wasser und 1 ccm Toluol hinzugefügt. Die Wirksamkeit solcher Extrakte wurde in 1- und 2 proz. Lösungen von Apfelpektin geprüft und zwar wurde die Menge des zersetzten Pektins und die Veränderung der Viskosität bestimmt.

Wirkungsoptimum des Fermentes bei p_H 3,4—3,6 und Temperatur 25—30°. Zur Gewinnung großer Mengen des Pilzes auf billigem Nährboden wird steriles Sägemehl aus Birkenholz mit Rübensaft durchfeuchtet, empfohlen. Auf diesem Nährboden kultivierte Botrytis cinerea ergab ein Pektinasepräparat, das in frisch ausgepreßtem Apfelsaft 90—100% Pektin zersetzte, den Saft klärte und ihn leicht filtrierbar machte. Das trockene Pektinasepräparat läßt sich lange aufbewahren. Ähnliche Versuche zur Klärung von Beerensaft zeigten, daß Fermentextrakte aus Penicillium glaucum stärker wirken, als Präparate aus Botrytis cinerea.

A. Imšenecki (Moskau).

Mikrobiologie der Nahrungs-, Genuß- und Futtermittel.

Moldavan, Andrew, A modified technic for the detection of the Escherichia-Aerobacter group in milk. (Am. Journ. of Publ. Health. Vol. 25. 1935. p. 1032—1033.)

Die bis jetzt offiziell angewendeten Gasbestimmungsmethoden in Brilliantgrün-Galle-Bouillon sind zu ungenau beschrieben, um nicht allen möglichen Variationen Raum zu lassen. Dies gilt besonders bezüglich der Größe der Röhrchen und der Mischungstechnik. So ergab sich z. B. nach den Untersuchungen des Verf.s, daß bei einer Beimpfung der sog. Durham-Röhrchen mit 1 ccm der betreffenden Impfmenge nur 0,1—0,5 ccm dieses Materials in das Innere des versenkten Gärröhrchens gelangt, während in den einarmigen Smith-Röhrchen diese Menge rund 0,5 ccm beträgt. Positive Resultate dürften daher bestenfalls auf 0,5 ccm, nicht aber auf 1,0 ccm der betreffenden Impfmenge bezogen werden (diese Rechnung stimmt insofern nicht ganz, als es infolge der Vermehrung und der Beweglichkeit der Coli-Organismen nicht darauf ankommt, das ganze Inoculum in das Röhrchen hineinzubekommen; auch die unbeweglichen Aerogeneskeime werden sich infolge der Schwerkraft zunächst am Grunde der Reagenzglaskuppe ansammeln und das gebildete Gas unmittelbar über der Öffnung des umgekehrt versenkten Gasröhrchens abscheiden. D. Ref.). Um diese Unzulänglichkeiten betreffs quantitativer Erfassung der Gasabscheidung zu vermeiden, schlägt Verf. in Anlehnung an den Paraffinabschluß beim Anaerobiennachweis folgende Technik vor: Die wie üblich mit ca. 9 ccm der sterilen Brilliantgrün-Galle-Bouillon beschickten Röhrchen werden mit der jeweiligen Milchmenge beimpft und ihr Inhalt durch Rollen zwischen den Händen gründlich durchgemischt. Hierauf gießt man vorsichtig sterilen, 45—55° heißen 2 proz. Agar längs der Innenwand auf die Bouillonoberfläche, wo dieser dann nach Abkühlen auf 37° C einen festen zylindrischen Verschluß bildet. In positiven Fällen läßt sich bereits nach 16 Std., in besonders schlimmen Fällen bereits nach 8 Std. eine Gasentwicklung durch Emporschieben des Agarpfropfens nachweisen.

K. J. Demeter (München-Weihenstephan).

Michaelian, M. B., and Hammer, B. W., Studies on acetylmethylcarbinol and diacetyl in dairy products. (Iowa Agr. Exp. Sta. Res. Bull. Vol. 179. 1935. p. 203—226.)

Die gemeinsame Bestimmung des Azetylmethylkarbinols und Diazetyls (A + D) erfolgte nach Destillation in Form des Nickelsalzes. Gleichzeitig wurden auch noch die flüchtigen Säuren und die Azidität (p_H) bestimmt.

Teil I. Es zeigte sich, daß diese beiden Verbindungen sich eher in der Buttermilch anreichern als in der Butter selbst. In 7 praktischen Betriebsversuchen variierte die Menge A + D im Rahm im Vergleich zu der in der Buttermilch von 1 : 2,0—1 : 3,1, während in Laboratoriumsversuchen diesbezügliche Verhältnisse von 1 : 1,1—1 : 2,1 gefunden wurden. In weiteren 52 Butterungsversuchen verhielt sich der Betrag an A + D im Rahm zu demjenigen der Butter wie 1 : 0,032—1 : 0,218. Das entsprach einer absoluten Menge von 0,1—34,5 mg des Nickelsalzes (äquivalent A + D) in 200 g Butter. Des weiteren war die Menge an A + D auch in der Butterlake immer bedeutend größer als im Fett selbst. Es konnte sehr oft beobachtet werden, daß der in die Molkereien angelieferte Rahm A + D enthielt, insbesondere war dies der Fall bei Sauerrahm. Frisch zentrifugierter Rahm von Milch geringen Keimgehalts ergab jedoch keine Beträge an A + D.

Teil II. Um die aktive Rolle der Zitronensäure-Vergärer bei der Bildung von A + D und flüchtigen Säuren genauer zu studieren, wurden Milchkulturen solcher Streptokokken durch Hitze, Formalin oder Chloroform abgetötet und daraufhin geprüft, ob dann noch eine Bildung von A + D eintritt, wenn 0,5% Zitronensäure bzw. 0,30% Schwefelsäure oder beide Säuren zusammen gereicht wurden. Dies war nicht der Fall. Ein ähnliches negatives Resultat wurde erhalten mit chloroformierten Abschwemmungen dieser Organismen von Würzeagar-Platten, wenn diese in mit 0,50% Zitronensäure versetzter Milch kultiviert worden waren. Die Bildung von A + D ist also an die aktiven Zellen gebunden. Es zeigte sich des weiteren, daß eine Erhöhung der Beträge von A + D weniger auf die Zufügung von Zitronensäure oder Schwefelsäure als solche zurückzuführen ist, sondern auf die gesteigerte Vermehrung der Zitronensäure-Streptokokken infolge der hierdurch erhöhten Wasserstoffionenkonzentration. Wenn der Milch beträchtliche Mengen Zitronensäure zugefügt worden waren, bildeten sich auf Grund der Gärungstätigkeit der Zitronensäurestreptokokken auch große Mengen an A + D. Die größte Menge Nickelsalz (äquivalent A + D), die jemals in einer mit Zitronensäure versetzten Milchkultur von Zitronensäurestreptokokken gefunden wurde, war 246,7 mg pro 200 g Milch. Solche Beträge wurden in gewöhnlichen Säureweckern nie erhalten. Die Bildung dieser Substanzen war übrigens immer wieder von einem Rückgang begleitet. Interessant ist weiter, daß sich nur ein sehr geringer Prozentsatz der zugefügten Zitronensäure tatsächlich wieder als A + D regenerieren ließ. Im besten Falle variierten die Beträge von 11,09—16,62%. Die Art und Weise, in welcher das Zitronensäure-Molekül abgebaut wird, ist jedenfalls noch nicht klar. Des weiteren sind A + D sowie 2,3-Butylenglykol keine Zwischenprodukte, aus denen die Zitronensäure-Vergärer flüchtige Säuren bilden könnten.

K. J. Demeter (München-Weihenstephan).

Fay, A. C., A method for the microscopic examination of butter. (Journ. of Dairy Sci. Vol. 18. 1935. p. 603—604.)

Durch diese Methode werden einige Schwierigkeiten des von Hammer und Nelson angegebenen direkten Verfahrens zur Untersuchung der Butterlake umgangen, indem der Gebrauch der Zentrifuge und der 0,01 ccm Kapillarpipette in Wegfall kommt. Die Technik ist folgende:

Die Butterprobe wird während höchstens 15 Min. bei 45° C geschmolzen und dann kräftig geschüttelt, um ein homogenes Gemisch zu bekommen. Davon wird $^1/_{10}$ ccm auf einen chemisch reinen Objektträger gegeben, 1 Tropfen Xylol und 1 Tropfen von Mayers Eiweiß-Glyzerin hinzugegeben. Die Mayersche Lösung hat den Zweck, den Butterausstrich auf dem Objektträger zu befestigen. Mit einer rechtwinklig abgebogenen Platinnadel wird hierauf das ganze Gemisch gründlich verrührt, bis es homogen geworden ist, und dann gleichmäßig über die ganze Oberfläche des Objektträgers verteilt. Es ist wichtig, daß das Mischen sorgfältig ausgeführt wird; es soll mindestens 2—3 Min. dauern. Anschließend wird getrocknet und das Albumin zur Gerinnung gebracht, indem man den Objektträger während 10—15 Min. auf ungefähr 80° erhitzt. Sodann folgt Fixieren in 70 proz. Alkohol während 10—20 Sek. und Trocknen. Hierauf wird der Objektträger während 2 Min. in Xylol getaucht und wiederum getrock-

net. Dann kommt der Ausstrich für 1 Min. in Methylenblaulösung; nach dem Auswaschen mit Wasser wird wieder in der Luft getrocknet. Die Untersuchung wird mit der Ölimmersion durchgeführt, nachdem der Gesichtsfeld-Durchmesser auf 0,157 mm eingestellt worden ist. Dann ergibt die durchschnittliche Zahl der Mikroorganismen pro Gesichtsfeld, multipliziert mit 1 Million, die Zahl der Keime pro ccm geschmolzener Butter. Wenn es als wünschenswert erscheint, unter Anwendung schwächerer Objektive jeweils größere Gesichtsfelder zu übersehen, stellt man den Durchmesser des Gesichtsfeldes mittels eines starken Trockensystems auf 0,351 mm oder mit einem schwachen Trockensystem auf 1,57 mm ein. In diesem Fall erhält man dann die Anzahl der Organismen pro ccm geschmolzener Butter durch Multiplikation der durchschnittlichen Gesichtsfeldkeimzahl mit 200 000 bzw. 10 000. — Diese Methode eignet sich auch für die bakteriologische Prüfung von hochprozentigem Rahm.

K. J. Demeter (München-Weihenstephan).

Hammer, B. W., The creatine test for acetylmethylcarbinol plus diacetyl in butter cultures. (Journ. of Dairy Sci. Vol. 18. 1935. p. 579—581.)

Die Technik geht auf O'Mearas Modifikation der Voges-Proskauer-Probe zurück und ist folgende: Man gibt 2½ ccm des Säureweckers in ein Reagenzglas und hierzu eine geringe Menge von Kreatin (falls in Pulverform vorhanden, ungefähr ¹/₃ des Volumens von einem Weizenkorn). Dann gibt man dem Volumen nach dieselbe Menge konz. Natrium-Hydroxydlösung (40 g aufgefüllt zu 100 ccm mit Wasser), mischt gründlich und läßt stehen. Sind verhältnismäßig große Mengen von Acetylmethylkarbinol und Diacetyl in der Kultur vorhanden, entwickelt sich auf der Oberfläche des Gemisches in wenigen Minuten oder auch früher eine rote Farbe, die bald bis zu ungefähr 6 mm in die Tiefe dringt. Säureweckerkulturen, denen es entschieden an gutem Geschmack und Aroma mangelt, dürften kaum eine Rötung zeigen, auch nicht, wenn das Reaktionsgemisch mehrere Stunden lang aufgestellt bleibt. Auch ein ganz schmaler roter Streifen auf der Oberfläche ist kein Beweis für ein gutes Säureweckeraroma. — Bloße Milchkulturen von Strept. lactis ergaben in der Regel keine positive Reaktion. Das Auftreten der Rotfärbung in Säurewecker-Kulturen wurde befördert, wenn der Milch Zitronensäure zugefügt worden war. Für die künftige Anwendung in der praktischen Butterkontrolle wäre es notwendig, ein Standardverfahren aufzustellen.

K. J. Demeter (München-Weihenstephan).

Lane, C. B., and Hammer, B. W., Bacteriology of cheese. I. Effect of pasteurizing the milk on the nitrogenous decomposition in cheddar-cheese. (Iowa Agr. Exp. Sta. Res. Bull. Vol. 183. 1935. p. 357—381.)

Da in neuerer Zeit des öfteren wieder Fälle von Erkrankungen und Epidemien nach Käsegenuß vorgekommen sind, gewinnt auch die Frage der Pasteurisierung von Käsereimilch größere Bedeutung. In Würdigung dieser Tatsache haben Verff. 9 Serienversuche mit Pasteurisierung von Cheddar-Käsereimilch angestellt. Bei 6 Versuchen wurden von derselben Ausgangsmilch je 2 Käse hergestellt, einer aus roher, der andere aus (dauer-) pasteurisierter Milch. Bei 3 Versuchen wurde neben anderen beiden ein dritter Käse zu 90% aus pasteurisierter und zu 10% aus roher Milch fabriziert. Zur Gewinnung des für die chemische Analyse notwendigen Käseserums wurde eine besonders wirksame Laboratoriumspresse konstruiert. Das vom Fett getrennte reine Serum opaleszierte und hatte gelbbraune Farbe, die mit zunehmendem Alter des Käses mehr ins Braune überging. Der Geschmack und Geruch war typisch nach Cheddar. Dieses Serum wurde auf folgende Bestandteile analysiert: 1. Gesamtstickstoff, 2. Ammoniakstickstoff (Van Slyke-Methode), ferner 3. in Trichloressigsäure, 4. in Äthylalkohol, 5. in Phosphorwolframsäure, 6. in Wolframsäure lösliche und unlösliche N-Verbindungen. Gleichzeitig wurde auch jedesmal der Wassergehalt des Käses bestimmt, sowie eine offizielle Begutachtung nach Geschmack und Geruch durchgeführt. — Ergebnisse: Versuchsserie 1—6. Im Laufe der Reifung konnte in allen Käsen

ein ständig fortschreitender Eiweißabbau, nachweisbar an der Zunahme der verschiedenen Eiweißfraktionen, festgestellt werden. Im Frühstadium der Reifung war noch kein diesbezüglicher Unterschied zwischen den aus roher und erhitzter Milch hergestellten Käsen zu bemerken. Nach längerer Reifung jedoch waren die Beträge der einzelnen Fraktionen im Serum der Rohmilchkäse entschieden größer, als es bei den aus pasteurisierter Milch hergestellten Käsen der Fall war. Am deutlichsten zeigte sich dies beim Amminostickstoff und bei der in Trichloressigsäure löslichen, in Äthylalkohol nicht löslichen Eiweißfraktion. Auch wies der Gesamtstickstoff in Rohmilch einen höheren Betrag an löslicher Substanz auf. Im übrigen hatten die Rohmilchkäse sämtliche typisches Cheddar-Aroma, was bei den Käsen aus pasteurisierter Milch in der Regel nicht der Fall war. — Versuchsserie 7—9 mit Mischmilch: Das Ergebnis bezüglich der Käse, die nur aus roher bzw. pasteurisierter Milch fabriziert worden waren, war im großen ganzen dasselbe, wie es eben beschrieben wurde. Bei Serie 9 zeigte der Käse aus erhitzter Milch Neigung zur Bitterkeit. Die aus Mischmilch hergestellten Käse nahmen bezüglich Eiweißabbaues eine Mittelstellung ein, in einem Falle jedoch war der Betrag an löslichem Gesamt-N höher als bei dem Rohmilchkäse der gleichen Serie. Das Aroma der Mischmilchkäse näherte sich bedeutend dem des typischen Cheddars und in einigen Fällen war es sogar dem der Rohmilchkäse überlegen.

K. J. Demeter (München-Weihenstephan).

Nielsen, N., Untersuchungen über den Gehalt der Bierwürze an durch Hefe assimilierbarem Stickstoff. (Compt. rend. Carlsb. Sér. physiol. Vol. 21. 1935. p. 113—138.)

Von den zwei möglichen Methoden zur Ermittelung des durch Hefe assimilierbaren N wurde diese gewählt: Die Würze wird durch N-freie Nährlösung verdünnt. Pilsnerwürze (10,7% Balling) wurde abgestuft bis zu 20fach mit dem synthetischen Medium verdünnt. In sämtlichen Konzentrationen näherte sich der N-Gehalt der Würze dem gleichen Endwert von 51—52%. Bis zur 3fachen Verdünnung fiel er zeitlich mit dem Zuckerverbrauch zusammen. In schwächeren Konzentrationen der Bierwürze wuchs die Hefe auch noch nach Einstellung der N-Aufnahme weiter. Durch Zugabe von $(NH_4)_2SO_4$ konnte eine weitere Assimilation des N durch die Hefe erzielt werden. Die N-Menge in der Würze nahm wieder zu, wenn Autolyse deutlich wurde. N muß für die Frage nach dem durch Hefe assimilierbaren Anteil unbedingt im Minimum sein. 6—10fache Verdünnung der Würze ist zu empfehlen. Die Trockensubstanzproduktion wurde bei Verbrauch des Zuckers eingestellt. Eine Wiederholung der Versuche mit Lagerbier- und sterilisierter Würze (Seitzfilter) führte zum gleichen Ergebnis. Die Temperatur übte keinen Einfluß auf die prozentische Aufnahme des N aus, lediglich die Dauer der Einstellung des Endwertes wurde — z. B. bei tieferer Temperatur — verlängert. Während des Brauprozesses sank der assimilierbare N-Gehalt gewichtsmäßig auf die Hälfte. Bei 37 untersuchten Würzeproben schwankte der Gehalt von 34—55%, über die Ursachen sind Untersuchungen im Gange. Durch den Gärprozeß gehen 30% verloren, den Rest findet man im Biere wieder. Auch andere Mikroben können den N der Würze assimilieren: Während Klöckeria apiculata (Hefe) jedoch nur 43% des Gesamt-N verbrauchte, ging dieser Betrag bei Saccharomyces cerevisiae auf 53 und bei Rhizopus suinus sogar bis auf 63%. Skallau (Berlin).

Nielsen, N., Untersuchungen über den Gehalt verschiedener Münchner Bierwürzen an assimilierbarem Stickstoff. (Wochenschr. f. Brauerei. Bd. 52. 1935. S. 259—261.)

Die zu untersuchenden Bierwürzen wurden mit 5 Teilen einer stickstofffreien Nährlösung vermischt. In dieser Lösung wurde der Stickstoff-

gehalt bestimmt und darauf mit Hefe so lange vergoren, bis keine Abnahme des Stickstoffs mehr zu konstatieren war. Der Anteil an assimilierbarem Stickstoff im Verhältnis zum Gesamtstickstoff bewegte sich bei hellen Würzen zwischen 37 und 54%, bei dunklen Würzen zwischen 30 und 46%, er war also bei den verschiedenen Brauereien recht verschieden. Daß er bei dunklen Würzen offenbar niedriger ist, als bei hellen, wurde auch bei der Untersuchung von im Laboratorium hergestellten Kongreßwürzen gefunden. Bei der Untersuchung dänischer Bierwürzen hatte Verf. mit der gleichen Methodik seinerzeit höhere Gehalte an assimilierbarem Stickstoff ermittelt, was mit Verschiedenheiten im Mälzungs- und Brauverfahren zusammenhängt.

Heuß (Berlin).

Garder, L., Tschelnokow, W., u. a., Silieren des Klees vom ersten und zweiten Schnitt. (Aus den Arbeiten d. Instituts f. landwirtschaftl. Mikrobiologie. Probleme d. Tierzucht. Bd. 5. 1934. S. 90—100.) [Russ.]

Mehrjährige Versuche mit Bereitung der Kleesilage zeigten, daß es in den meisten Fällen nur mit dem Klee vom zweiten Schnitt gelingt, gute Silage zu bekommen; dagegen liefert Klee vom ersten Schnitt selten gute Resultate. Die bis jetzt vorgeschlagenen Methoden zur Kleesilierung (der Zusatz vom Zucker, von HCl u. a. konservierenden Mitteln) zeigten bei den Versuchen geringe Effektivität und erhöhten sehr die Unkosten. Verff. empfehlen die von ihnen ausgearbeitete Methode zur Kleesilierung unter der Benutzung der aus der guten Kleesilage gewonnenen Bakterien der Milchsäuregärung, mit welcher sehr gute Resultate bei minimalen Unkosten erzielt wurden. Man bekam mit dieser Methode in allen untersuchten Fällen sehr gute Kleesilage mit p_H nicht über 4,2 und mit einem Milchsäuregehalt um 1%. Außerdem wurde auf diesem Wege eine bedeutende Verminderung der Nährstoffverluste (an Kohlehydraten und Eiweißstoffen) erreicht.

M. Gordienko (Berlin-Schöneberg).

Garder, L., Balin, E., Ssokolowskaja, G., u. a. Silieren des Waldlaubes. [Ssilosowanije list'jew drewesnych porod.] (Probleme der Tierzucht. Bd. 4. 1934. S. 53—61.) [Russisch.]

Die Leningrader zonale Versuchsstation für Milchwirtschaft stellte mehrjährige Versuche (Laboratoriumsversuche) mit Ensilieren des Waldlaubes an und kam zu folgenden Ergebnissen: Die Zugabe von Zucker zur Laubsilage (Birken- und Espenlaub) trug sehr wenig zur qualitativen Verbesserung der Silage bei. In den beiden Proben (mit und ohne Zucker) stellte sich der p_H-Wert auf 4,8 ein, bei sehr geringem Gehalt an Milchsäure. Auch die mikrobiologische Analyse bestätigte die geringe Eignung des Waldlaubes zu Silagezwecken. Die Mikroflora der beiden Silageproben (mit und ohne Zucker) erwies sich qualitativ fast gleich und war sehr reich an den den Nährstoffwert der Silage mindernden Bakterienarten. So fand man in der Silage Fäulnisbakterien, Coli aerogenes u. ä. Arten, auf den festen Silagebestandteilen aber Bac. mesentericus, Bac. subtilis, Bac. megaterium, Bac. fluorescens usw. Auch die Zugabe von saurer Milch, Kleie und Mehl zur Silage hat keine nennenswerte Besserung gebracht, dagegen erzielte man bessere Resultate mit reinen Kulturen der Milchsäuregärung (der p_H ging auf 3,75—3,90 herab, die Silage bekam einen guten Geruch und sauren Geschmack). Ensilierungsversuche mit abgewelktem Laub haben zu denselben Ergebnissen geführt.

M. Gordienko (Berlin).

Mikrobiologie des Düngers, Bodens, Wassers und Abwassers.

Znamensky, W. und **Archarow, M.**, Über die Nitrifikation in südlichem Tschernosjem des Nord-Kaukasus. (Sammlungen der wissenschaftl. Forschungsarbeiten. Nr. 96—106. 1934.) [Russ.]

Der südliche Tschernosjemboden zeichnet sich durch stärkere Nitrifikationsprozesse als derjenige im Kubangebiet aus. Die höchste N- (NO_3-) Menge stellte man auf der Brache fest (bis zu 10 dz/ha Salpeter zur Zeit der Winteraussaat). Frühe reine Brache zeigte größere N- (NO_3-) sowie Wassermengen als späte Brache.

M. Gordienko (Berlin-Schöneberg).

Burgwitz, G., Die Denitrifikation als Resultat der kombinierten Bakterientätigkeit. (Arbeiten des Allrussischen Instituts f. landwirtschaftl. Mikrobiologie. Bd. 5. 1933. S. 52—57.) [Russ.]

Aus der Grauerde Turkestans sonderte Verf. zwei Bakterienarten aus, die bei ihrer gleichzeitigen Kultur den Denitrifikationsprozeß hervorrufen. Bac. turanicum reduziert Nitrate zu Nitriten, und Bac. nitrosovorum überführt Nitrite zu freiem N.

M. Gordienko (Berlin-Schöneberg).

Scheloumowa, A. und **Protod'jakonow, O.**, Die Rolle des Azotobakters in Stickstoffernährung der höheren Pflanzen. (Arbeiten des Allrussischen Instituts f. landwirtschaftl. Mikrobiologie. Bd. 5. 1933. S. 119—130.) [Russ.]

Gefäßversuche mit sandigem Podsolboden ($p_H = 6,5$) zeigten, daß die Impfung des Bodens mit Azotobakter zu einer bedeutenden Ertragssteigerung führt (Versuchspflanze Tabak). Die Ertragssteigerung wurde auf dem gekalkten sowie ungekalkten Boden festgestellt. Doch führte die Kalkung zu erhöhten Stickstoffverlusten aus dem Boden. Bei den Versuchen mit unbestellten Gefäßen wurde keine Anreicherung des Bodens mit Stickstoff festgestellt. Auf Grund dessen kommen die Verff. zu dem Schluß, daß die stickstoffbereichernde Tätigkeit des Azotobakters nur in Verbindung mit Wurzelausscheidungen der Pflanzen zur Geltung kommt.

M. Gordienko (Berlin-Schöneberg).

Ssawostin, P., Zur Frage über die Anwendung der den Boden mit Bakterien bereichernden Düngung in Tajgagebieten Westsibiriens. (Zum Problem der Agrochemie in Westsibirien. Nowossibirsk. 1934. S. 71—86.) [Russ.]

Die sogen. „Tajgaböden" Westsibiriens stellen meist schwach gesättigte und schwach strukturgeformte Podsolböden mit einem Humusgehalt von nicht über 4,0%, einem N-Gehalt von 0,3% und P_2O_5-Gehalt von nicht über 0,2% dar. Sumpfige und sekundäre Tajgapodsolböden zeigen sehr schwache Nitrifikation. Verf. gab auch diesen Böden Torf mit Kalk und Mikroorganismen (Azotobakter und zellulosezersetzende Bakterien) und erzielte auf diesem Wege folgende Mehrerträge: mit Hafer auf dem hellgrauen Boden — um 11%, auf dem sekundären Podsolboden — um 16% usw. Auch die Impfung des Saatgutes (Erbsen-, Lupinen-, Kleesamen usw.) mit Knöllchenbakterien führte zu einer bedeutenden Ertragssteigerung, die sich in Grenzen von 6% bis etwa 48% bewegte. PK-Gaben mit Torf förderten die Arbeit der freilebenden Stickstoffassimilanten, Phosphate förderten die Stickstoffassimilation der Knöllchenbakterien. M. Gordienko (Berlin-Schöneberg).

Ssorokina, A., Zur Frage über die Rolle der Mikroorganismen im Humusbildungsprozeß. (Arbeiten des WIUA. Folge 4. 1934. S. 75.) [Russ.]

Zur Humusbildung im Boden dient u. a. auch die Masse der abgestorbenen Mikroorganismen. Verf. stellte Versuche mit abgetötetem Myzel von Aspergillus niger an und kam zu den folgenden Ergebnissen: Bei der Zersetzung dieses Myzels in einem flüssigen Medium bildet sich kein Humus, da es sich unter diesen Bedingungen völlig mineralisiert. Im Boden (Grauerde und „künstlich hergestellter Boden" mit 67% Sand, 18% Lehm, 2% Kreide und 13% organische Stoffe) konnte man die Humusbildung aus dem Myzel von Asp. niger deutlich verfolgen, wobei dieser Prozeß stärker in der Grauerde als in dem künstlich hergestellten Boden vor sich ging. Einige Mikroorganismen (wie Asp. flavus) störten den Humusbildungsprozeß. Die synthetische und die zerstörende Wirkung der Mikroorganismen wird von der Bodenreaktion beeinflußt, und zwar wird durch die alkalische Reaktion ($p_H = 8$) die mineralisierende Wirkung der Mikroorganismen, durch die sauere aber ($p_H = 5{,}0$) die synthetische gesteigert. Verschiedene Düngemittel (Superphosphat, $CaCN_2$ u. a.) beschleunigten in vielen Fällen die mineralisierende Wirkung der Mikroorganismen.

M. Gordienko (Berlin-Schöneberg).

Butkewitsch, W. und **Naidina, O.**, Mikrobiologische Methoden zur Bestimmung des Düngerbedürfnisses der Böden. (Die Chemisation der soz. Landwirtschaft. Bd. 4 u. 5. 1933. S. 62—70, 56—68.) [Russisch.]

Verff. benutzten zur Bestimmung des Düngerbedürfnisses der Böden an Phosphorsäure statt Aspergillus niger A. oryzae und kamen zu folgenden Ergebnissen: 1. Verglichen mit vielen anderen Methoden der Bestimmung der Phosphorsäure- und Kalimengen im Boden, bietet die Pilzkultur bedeutende Vorteile und entspricht den praktischen Forderungen bei dieser Bestimmung, dies vor allem bezüglich des Kalis. 2. Aspergillus niger kann sehr bequem durch A. oryzae ersetzt werden, was seinen Vorteil darin hat, daß man für dieselbe Menge von Phosphorsäure ein größeres Myzelgewicht bekommt und daß A. oryzae dabei eine geringere Azidität entwickelt als die erstgenannte Kultur. 3. Bei der Bestimmung der Phosphorsäure in Karbonatböden erscheint es als sehr zweckmäßig, für jeden Boden zwei Versuchsreihen durchzuführen, und zwar mit und ohne Zerstörung der Karbonate. 4. Bei der Bestimmung der Kalimengen in Karbonatböden erscheint die Zerstörung der Karbonate als nicht notwendig.

M. Gordienko (Berlin).

Krawkow, S. und **Ssimakow, W.**, Die Wirkung der Bodenbedeckung auf biochemische Prozesse. [Wlijanije prijemow mul'čirowanija počwy na chod ee biochimičeskich prozessow.] (Die Chemisation der soz. Landw. Bd. 6. 1933. S. 20—24.) [Russisch.]

Verf. kommt zu den folgenden Schlüssen: Die Bedeckung des Bodens (mit Stroh, Torf, Pappe usw.) führt zur Intensivierung der den Boden (Torf- und Podsolboden) mit Ammoniakverbindungen bereichernden Prozesse; dasselbe ließ sich auch bezüglich der Nitrate feststellen. Weiter setzt die Zudeckung des Bodens die Auswaschung der Nährstoffe aus den oberen Bodenhorizonten herab und trägt zur Vermehrung der Bakterienflora bei.

In Torf- und Podsolböden bewirkte sie außerdem die Vermehrung des wasserlöslichen Humus, während in kastanienfarbigen Böden das Entgegengesetzte der Fall war. M. Gordienko (Berlin).

De'Rossi, G., La fixation de l'azote élémentaire dans le sol. V. Une cause d'erreur dans la détermination du pouvoir azotofixateur des microbes. (Soc. Intern. di Microbiol. Boll. della Sez. Ital. Vol. 7. 1935. p. 218—221.)

Verf. hat den Beweis erbracht, daß scheinbarer Stickstoffgewinn bei der mikrobiellen Zersetzung verschiedener organischer stickstoffhaltiger Substanzen nicht immer auf Stickstoffbindung beruhen muß, sondern häufig nur auf einer Umformung organischer Verbindungen, deren Stickstoff nach der Kjeldahlmethode nicht quantitativ erfaßt wird, in solche, deren Stickstoff nach Kjeldahl bestimmbar ist. Eine Nichtbeachtung dieser Tatsache kann zu Irrtümern Anlaß geben. Bortels (Berlin-Dahlem).

Rosow, L., Die Veränderungen der Dispersität des Bodens unter dem Einfluß biologischer Prozesse. [Izmenenije dispersnosti počw pod wlijanijem protekajutschich w nich biologičeskich prozessow.] Verlag Sel'kolchosgis. 58 S., m. 25 Tab. u. 5 Abb. [Russisch.]

Die Versuche bezweckten, den Dispersitätsgrad des lufttrockenen Bodens und eines solchen, der aerob-biologischen Prozessen ausgesetzt war, zu vergleichen. Versuchsergebnisse: Der aerob-biologische Prozeß peptisiert die Dispersionsphase des Bodens in hohem Grade. Untersuchungen mit verschiedenen Sedimentierfristen haben gezeigt, daß die Dispersität des „aktiven Bodens" zweimal größer war als die des lufttrockenen. Die Peptisierung des Bodens unter dem Einfluß des aerob-biologischen Prozesses erklärt Verf. durch die Zerstörung der organischen Stoffe durch Mikroorganismen usw. M. Gordienko (Berlin).

Krassil'nikow, N., Zur mikrobiologischen Charakteristik der Böden des Transwolgagebietes. (Arbeiten der Irrigationskommission. Folge 3. 1934. S. 141—194.) [Russ.]

Verf. studierte die Wirkung der Bewässerung auf die Mikroflora des Bodens und auf die Rhizosphäre einiger Kulturpflanzen (Weizen, Roggen, Hafer u. a.). Die qualitative Zusammensetzung der Mikroflora stellte sich in den bewässerten und nicht bewässerten Böden gleich. Die Nitrifikation verlief sehr intensiv in den bewässerten und nassen Böden, während in den bewässerten und dann trocken gewordenen Böden die intensivste Zellulosezersetzung beobachtet wurde. Die Intensität der biochemischen Prozesse im Boden erreicht ihren Höchstpunkt am 5.—7. Tage nach der Bewässerung, wonach sie ziemlich rasch fällt. Vor der Bewässerung überwiegen im Boden sporentragende, nach der Bewässerung aber sporenlose Bakterien. Die Wurzelausscheidungen der Kulturpflanzen bedingen im Bereich ihrer Rhizosphäre die Vermehrung einer spezifischen Mikroflora (fluoreszierende Denitrifikatoren usw.). Die qualitative und quantitative Zusammensetzung der Mikroflora im Bereiche der Rhizosphäre hängt u. a. auch vom Alter der Kulturpflanzen ab. M. Gordienko (Berlin-Schöneberg).

Chandurin, A., Die Wirkung verschiedener Faktoren auf die Anreicherung des Bodens mit Luftstickstoff durch Leguminosen. (Die Chemisation d. soz. Landw. Bd. 7. 1934. S. 42—48.) [Russ.]

Auf Grund mehrjähriger Feldversuche auf der ausgelaugten Schwarzerde kommt Verf. zu dem Schluß, daß die Anreicherung des Bodens mit Stickstoff durch Leguminosen sehr großen Schwankungen unterworfen ist, die vor allem durch die Boden- und Wachstumsverhältnisse der stickstoffsammelnden Pflanzen bedingt werden. Eine große Rolle spielen dabei: 1. die richtige Auswahl der stickstoffsammelnden Pflanzen für die betreffenden Verhältnisse; 2. die Dichte der Aussaat dieser Pflanzen; 3. die Anwendung der Phosphorsäuredünger (insbesondere des Superphosphats), die zur Luftstickstoffassimilation wesentlich beitragen. — Auf der untersuchten ausgelaugten Schwarzerde hat sich Linse, sodann eine Mischung von 180 kg Wicke + 90 kg Hafer je ha als besonders gut erwiesen. Dichte Aussaat nimmt aus dem Boden große Stickstoffmengen auf, und so werden die Knöllchenbakterien zu einer verstärkten Luftstickstoffassimilation angeregt. M. Gordienko (Berlin-Schöneberg).

Ssimakow, W. und **Issakowa, A.**, Die Wirkung der Sättigung des adsorbierenden Komplexes mit Eisen auf biochemische Bodenprozesse. (Počwowedenije. Bd. 2. 1933. S. 170—183.) [Russ.]

Die Versuchsergebnisse zeigten, daß die Sättigung des adsorbierenden Komplexes der Schwarzerde und des Podsolbodens mit Eisen einen sehr großen Einfluß auf die gesamten biochemischen Prozesse in diesen Böden bewirkt. Nach der Sättigung mit Eisen stellte sich in diesen Böden die Anreicherung mit Nitraten gänzlich ein, während die Anreicherung mit Ammoniakverbindungen noch weiter vor sich ging. Außerdem zeigten die mit Eisen gesättigten Böden, insbesondere die Schwarzerde, eine bedeutende Herabsetzung ihres p_H-Wertes. M. Gordienko (Berlin-Schöneberg).

Rippel, A., Fossile Mikroorganismen in einem permischen Salzlager. (Archiv f. Mikrobiologie. Bd. 6. 1935. S. 350—358.)

Durch Auflösen in Wasser und Färbung mit Carbol-Erythrosin konnten in Steinsalz und Sylvinit des Salzlagers von Reyershausen nördlich von Göttingen in Proben aus 911 m Tiefe Bakterien nachgewiesen werden, die zum wenigsten nicht rezent sein können. Wachstum erfolgte nicht; auch die völlig trockene Beschaffenheit des Gesteins läßt keine lebenden Keime erwarten. Sylvinit ergab etwas andere Bilder als Steinsalz. Ausgedehntere Versuche können aber erst entscheiden, ob sich bestimmte Mikroorganismen-Spektren ergeben, die zu weitergehenden Schlüssen Veranlassung geben könnten. Rippel (Göttingen).

Schädigungen der Pflanzen durch Pilze, Bakterien und filtrierbare Vira.

Straib, W., Auftreten und Verbreitung biologischer Rassen des Gelbrostes (Puccinia glumarum [Schm.] Erikss. et Henn.). (Arb. d. Biolog. Reichsanst. Bd. 21. 1935. S. 455—466.)

Verf. untersuchte 1934 114 Gelbrostproben von 74 Orten des In- und Auslandes. Aus diesen Proben wurden 169 Einsporstämme gewonnen. Es ließen sich 14 biologische Rassen, darunter 3 neue, mit den Nummern 23, 24, 25 nachweisen. Die Rassen 23 und 24, die in Holland, Deutschland und Frankreich gefunden wurden, waren besonders agressiv auf Gerste. Weizen

wurde nur in geringem Umfange befallen. 1934 erfuhr die Rasse 7 in Deutschland eine weitere Verbreitung. Diese ist dadurch bedingt, daß Weizensorten in stärkerem Maße angebaut wurden, die dieser Rasse ebenso wie der Rasse 3 auch bei trocken-heißer Frühjahrs- und Sommerwitterung in genügendem Maße Infektions- und Fruktifikationsmöglichkeiten bieten.

Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Straib, W., Infektionsversuche mit biologischen Rassen des Gelbrostes auf Gräsern. (Arb. d. Biolog. Reichsanst. Bd. 21. 1935. S. 483—497.)

227 Gräserarten wurden mit 3 biologischen Rassen von Puccinia glumarum (Schm.) Erikss. et Henn., den Rassen 24, 2 und 18, beimpft. Rasse 24 entspricht der forma specialis hordei Erikss., Rasse 2 der forma specialis tritici Erikss., Rasse 18 nimmt eine Mittelstellung ein. Die Versuche ergaben, daß Verschiedenheiten im Infektionsverhalten der 3 Gelbrostarten auf Gräsergattungen, die die Beibehaltung der forma specialis rechtfertigen, nicht bestehen. Die für die Versuche verwendeten Gräserarten und der beobachtete Infektionstypus sind in Tabellen aufgeführt. Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Straib, W., Über Gelbrostanfälligkeit und -resistenz der Gerstenarten. (Arb. d. Biolog. Reichsanst. Bd. 21. 1935. S. 467—481.)

187 Gerstensorten (27 Winter- und 158 Sommerformen) wurden im Keimlingsstadium im Gewächshaus auf ihre Anfälligkeit gegen 13 biologische Rassen des Gelbrostes (Puccinia glumarum [Schm.] Erikss. et Henn.) geprüft. Gegen die 1934 isolierten Gelbrostrassen 23 und 24 erwiesen sich nur wenige Sorten resistent oder immun. Gegen die übrigen Gelbrostrassen waren die geprüften Gerstensorten zum überwiegenden Teil immun oder hoch resistent. Ackermanns Bavaria, Heils Franken und Heines Hanna zeichneten sich durch Resistenz gegen die in Deutschland und Holland verbreitete Gelbrostrasse 23 aus. Diese Sorten waren auch immun gegen sämtliche „Weizen“-Gelbrostrassen. Anfällig waren sie nur gegen die in Frankreich nachgewiesene Rasse 24. Eine zu Hordeum vulgare pallidum gehörende Gerstensorte blieb gegen 25 bisher bekannte Gelbrostrassen immun. Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Mains, E. B., Rust resistance in Antirrhinum. (Phytop. Vol. 25. 1935. p. 977—991, 2 figs.)

Bei seinen Untersuchungen fand Verf., daß nur Spezies von Antirrhinum von Puccinia Antirrhini, nicht solche von Linaria und Adenostegia pilosa befallen wurden. Von Antirrhinum majus zeigten nur wenige Selektionen eine gewisse Resistenz. Von diesen wurden durch Selbstungen und Selektionen hoch resistente Typen erhalten. Hoch resistente Typen ergaben auch Kreuzungen von Antirrhinum majus und A. glutinosum und A. Ibanjezii. In allen Fällen stellte es sich heraus, daß Resistenz als einfacher dominanter Faktor vererbt wird.

Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Osterwalder, A., Die Macrophoma-Fäulnis der Äpfel. (Landw. Jahrb. d. Schweiz. Jahrg. 49. 1935. H. 5. S. 565—570.)

Es handelt sich um eine Fäulnis, die außerordentlich schwer an Lageräpfeln auftrat. Zu den Versuchen wurde die französische Lederrenette be-

nutzt. Zu Beginn der Krankheit färbte sich das Fruchtfleisch, vom Stiel ausgehend, lila, und später wurden Haut und Fruchtfleisch teilweise oder gänzlich schwarz. Durch Infektionsversuche konnte als Ursache der bisher in Wädenswil unbekannten Lagerfäule ein Fadenpilz ermittelt werden, der durch seine Sporen zur Gattung Macrophoma zu rechnen ist und große Ähnlichkeit mit Macrophoma malorum aufweist. Pykniden entwickelten sich selten und wurden nur an den Stielen der Äpfel beobachtet.

Bärner (Berlin-Dahlem).

Tierische Schädlinge.

Caird, R. W., Physiology of pines infested with bark beetles. (Bot. Gaz. Vol. 96. 1934/35. p. 709—733.)

Es wurde ein künstlicher Befall von Pinus tadea, P. echinata und P. virginiana in North-Carolina mit Dendroctonus frontalis und Ips avulsus hervorgerufen. Diese beiden Borkenkäfer durchbohren die Rinde und graben ihre Gänge im Phloem, nie dagegen im Xylem. Ihr Lebenszyklus dauert etwa 30—40 Tage, in einem Sommer können 3—5 Bruten stattfinden. Nach dem Angriff der Käfer trocknet die Rindenpartie aus, der Transpirationsstrom wird empfindlich gestört, wie durch Färbeversuche gezeigt werden konnte. Sobald die Luft freien Zutritt hat, stellen sich Pilze ein, die schließlich das Absterben der Bäume verursachen: Ceratostomella sp., Trichoderma lignorum, Penicillium sp., Aspergillus sp. Dazu kommen Bakterien und Hefen und ein nicht näher identifizierter Pilz. Ceratostomella ist es in erster Linie, der für die Kiefer tödlich wirkt. Wurde der Luftzutritt durch Bekleiden des Baumes mit Wachs verhindert, so blieb er am Leben, trotzdem die Käfer die Rinde angriffen. Cerastostomella pini greift tief ins Holz ein, er wurde noch im 10. Jahresring beobachtet.

Skallau (Berlin).

Goffart, H., Über Schadauftreten von Stockälchen an Rüben und Sellerie. (Deutsche Landwirtschaftl. Presse. 62. Jahrg. 1935. S. 3.)

In den letzten Jahren machten sich in steigendem Maße Schädigungen durch Stockälchen (Anguillulina dipsaci) an Rüben geltend. Die von der Krankheit befallenen Rüben zeigen zunächst bräunliche Flecke am Rübenkörper; später werden diese Stellen rissig und faul. Da unmittelbar wirksame Mittel bei der Lebensweise der Schädlinge nicht zur Anwendung gebracht werden können, empfiehlt sich Aussuchen und schnelles Verfüttern der erkrankten Rüben. Die Krankheit wurde auch an Sellerie beobachtet.

Goffart (Kiel-Kitzeberg).

Berichtigung.

In Heft 5/8 des Bandes 94 ist auf Seite 128 Abb. 2 auf den Kopf gestellt. Es handelt sich um eine Aufnahme von Lupinen, deren Wurzeln nach oben gerichtet sind.

Abgeschlossen am 17. Juni 1936.

Zentralblatt für Bakt. etc. II. Abt. Bd. 94.
Ausgegeben am 4. August 1936.

Prospects for a natural system of classification of bacteria.

By A. J. Kluyver and C. B. van Niel.

With 1 figure in the text.

I. Motives for a renewed discussion of the subject.

At the present time only two systems of bacterial classification are in more general use. In Europe the system of Lehmann and Neumann[1]) is still prevalent, whilst in America many bacteriologists adhere to the system given in Bergey's Manual of Determinative Bacteriology[2]). Yet it is certain that several investigators have felt that these systems are unsatisfactory both from a practical and from a taxonomic standpoint.

As a consequence several new or amended systems have been proposed which, however, have failed to draw the attention of the majority of bacteriologists. Amongst these there are a few contributions which well deserve a wider appreciation, because they are based upon what seems to the authors of the present essay a sound realization of the principles of scientific taxonomy. These studies often give evidence of a profound knowledge of the literature pertaining to the subject. Nevertheless, it is to be regretted that the most notable of the authors seem to be unaware of the existence of similarly directed efforts. Hence valuable suggestions offered by one author have not been considered by the kindred writers, although these might have materially aided in ensuring the success of the various attempts.

Under these circumstances it seems profitable to expound again the guiding principles of a rational taxonomy, to point out the deficiencies of the recently proposed systems, and finally to develop a classification which is largely built on the meritorious elements of many preceding studies and in which, on the other hand, fallacies inherent in many of these are avoided.

II. Principles in bacterial classification.

If one examines the various systems of bacteria proposed up till now, it becomes evident that many of these systems are almost entirely the outcome of purely utilitarian motives. Very often such artificial systems are ultimately impractical because as a rule newly discovered facts necessitate profound modifications or even the construction of new systems at short intervals.

Naturally, the only truly scientific foundation of classification is to be found in an appreciation of the available facts from a phylogenetic point of view. Only in this way can the natural interrelationships of the various bacteria be properly understood. It has to be admitted at once that, in-

[1]) Lehmann, K. B. und Neumann, R. O., Bakteriologische Diagnostik. 7. Aufl. München 1926/27.

[2]) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 4th Ed. Baltimore 1934.

asmuch as the course of phylogeny will always remain unknown, the basis of a true phylogenetic system of classification will be very unstable indeed. On the other hand it cannot be denied that the studies in comparative morphology made by botanists and zoologists have made phylogeny a reality. Under these circumstances it seems appropriate to accept the phylogenetic principle also in bacteriological classification.

The question then arises in which characters phylogeny expresses itself. There is no doubt that in this respect morphology remains the first and most reliable guide. It is, however, a commonplace in systematic bacteriological literature to bewail the scantiness of suitable morphological data. This, in turn, is chiefly responsible for the unsatisfactory state of bacterial taxonomy.

This situation has, already a long time ago, induced several authors to apply characters of a physiological nature in addition. The first steps in this direction were made timidly, but gradually the defendents of the good right of a physiological basis for taxonomy have become more and more numerous.

It seems superfluous to dwell upon this evolution here. It may suffice to remark that nowadays the indispensability of physiological characters for the purpose of classification has been generally accepted, which is only natural because, after all, these physiological differences must be considered as expressions of variations in submicroscopical morphology.

In this connection the predominant problem is only how the macromorphological and the micromorphological (physiological) characters should be rated. On the one hand we may refer to Orla-Jensen's classification[1]) which is an extreme example of the concept that physiological characters should determine the main lines of the system. In contrast herewith Prévot[2]) recently formulates one of his laws of bacteriological systematics as follows: "les caractères physiologiques sont des caractères spécifiques", thus forbidding the use of physiological characters for the demarcation of units of higher systematic rank than the species. However, in another passage of his treatise Prévot obviously takes exception to his law by allowing for the creation of genera on a physiological basis in such cases where otherwise the morphological genera would become overburdened.

Personally we are of the opinion that Prévot rightly emphasizes the priority of morphological over physiological characters. Yet his restriction that the application of the latter should be confined to delimitation of species is of a quite arbitrary nature. In accepting the taxonomic value of physiological characters it cannot be understood why they could not also be applied for the demarcation of higher systematic units.

In support of this view we wish to observe that such a procedure is not at all limited to bacteriological classification. A typical example is offered by algologists who do not hesitate to support the separation of the class of Heterocontae from that of the Isocontae by such typical physiological features as the nature of the storage products, the proportion of the pigments present, and the chemical constituents of the cell wall[3]).

---

1) Orla-Jensen, S., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 22. 1908. S. 97; 1909. S. 305; Bd. 24. 1909. S. 477.

2) Prévot, A. R., Ann. d. Sc. nat. Bot. 10me Sér. Vol. 15. 1933. p. 23.

3) Cf. e.g.: West, G. S., and Fritsch, F. I., A treatise on the British Freshwater Algae. Cambridge 1927. p. 21.

There is, moreover, a second reason why it is only rational to use physiological characters not exclusively for differentiation of species but also for uniting them into higher groups. This reason is to be found in the fact, that the mere act of cultivating a bacterium, of thus gradually familiarizing oneself with the various aspects of the organism, leads to a more or less unconscious inclusion of the physiological characteristics in fixing its systematic position. In other words, no bacteriologist can be satisfied with a classification which combines in one genus organisms which behaved quite dissimilarly in his preliminary work. To cite just one example: the microscopical appearance of some of the aerobic sporeforming bacteria and that of certain types of butyric acid bacteria may show a striking resemblance, yet the technique in handling and the nutritional requirements of both groups are so obviously different that it will be distasteful to the majority of bacteriologists to incorporate these organisms into one and the same genus.

One is thus led to the conclusion that among the physiological characteristics there are some which should be used in separating larger groups and the question is which ones may be deemed to be essential in this respect. Now it is clear that differences in nutritional requirements are conditioned by differences in the metabolic activities of the organisms. Thus the problem resolves itself in grading the metabolic properties according to their intrinsic value. A lack of insight in the fundamentals of metabolism has thus far been the great stumbling-block for a rational application of physiological characteristics in taxonomy and it also explains the horror with which many systematicians have witnessed their ever increasing use.

In surveying the metabolism of the various bacteria one is struck by its great diversity which contrasts sharply with the relatively great uniformity characteristic for the metabolism of higher plants and animals. An analysis of this situation bears out that, whereas the anabolic processes are essentially similar in both cases the fundamental differences are to be found in katabolism. It is especially the many different ways in which bacteria succeed in meeting their energetic requirements which draw the attention. Besides the respiration process, as it is also found in higher organisms, we encounter numerous instances in which this process is substituted for by conversions in which free oxygen does not take any part. Moreover, all these processes are characterized as well by the diversity of their substrates as by the different ways in which these substrates are converted into the final products of katabolism.

The fundamental nature of the energy providing processes justifies the view that they should be rated first amongst the physiological characters suitable for classification, the more so since these properties are typically reflected in the cultural behaviour of the organisms.

If, in consequence of this, one is led to the creation of systematic groups on the basis of katabolic properties is not the principle of phylogeny as a taxonomic basis endangered? This needs not be the case provided this principle is duly subordinated to the requirements ensuing from a primarily morphological classification. For it does not seem excluded at all that in a single morphological group a physiological evolution is responsible for the differences in katabolism observed, whereas parallel evolutionary processes may have taken place in various morphological units.

One might object to this hypothesis, since the differences in katabolism seem to be of such an absolute nature as to exclude any evolutionary idea.

However, recent development in the study of bacterial metabolism seems well suited to modify this view. A closer analysis of the katabolic processes has revealed their fundamental unity and made it possible to connect the differences observed largely with differences of a quantitative nature in some special property of the living cell[1]).

This quantitative gradation implies that also the physiological groups do not show any sharp lines of demarcation. Hence, the boundaries imposed by the intuition of the investigators will always bear a more or less arbitrary character. The situation seems comparable with that existing in colour distinction. Although every one will accept the validity of such clearly distinguishable colours as red, green, blue, yet a glance at the spectrum is convincing evidence that also in this case boundaries are lacking.

It is obvious that the resulting taxonomic difficulty will be felt most severely in the determination of the ultimate systematic unit, the species. The masterly way in which Benecke, as early as 1912, has expressed himself on this matter justifies the quotation in extenso of the following passage[2]).

„Was sind nun die Arten, d. h. die niedrigsten von den eben aufgeführten systematischen Einheiten?

Die Antwort lautet: Das, was der Forscher, welcher die Art aufstellt, nach seinem „wissenschaftlichen Takt" darunter zusammenfaßt. Anders kann die Frage offenbar darum nicht beantwortet werden, weil die Natur selbst keine Arten kennt, sondern nur Individuen mit ihrer Aszendenz und Deszendenz, also nur sog. „Linien", und solche Linien faßt eben der Systematiker zu Linienbündeln zusammen, die er Arten nennt. Wie groß oder wie klein er sein Bündel schnüren will, das hängt von seiner wissenschaftlichen Auffassung ab, die von der eines anderen mehr oder minder abweichen kann. Freimachen von dieser subjektiven Umgrenzung der Arten würde sich der Systematiker dann, wenn er auf noch niedrigeren Einheiten als den Arten fußen wollte, eben jenen Linien. Er müßte dann alle Bakterien in Form von Einzellkulturen züchten, und zwar unter den denkbar verschiedensten Bedingungen, unter denen sie überhaupt zu leben vermögen, würde sich all ihre Formen und Eigenschaften in Abhängigkeit von diesen Bedingungen merken und sie in die Diagnose der betreffenden Linie aufnehmen. Alle die reinen Linien, die dann keine Unterschiede in der Diagnose aufweisen würden, müßte er zu systematischen Einheiten zusammenfassen, zu sog. elementaren Arten, und diese von willkürlicher Umgrenzung wenigstens einigermaßen freien Einheiten nach Gutdünken zu höheren Einheiten zusammenfassen. Tatsächlich ist das nicht möglich; das braucht nicht weiter begründet zu werden, denn jene eben skizzierte Arbeit würde kein Ende absehen lassen. So müssen denn für die praktischen Zwecke der Systematik, d. h. um eine Übersicht über die Formen zu ermöglichen, höhere systematische Einheiten gewählt werden."

Hence it follows that in an attempt to subdivide the organisms belonging to one "natural" group of bacteria into species one shall have to create as many species as there are organisms which differ in "sufficiently fundamental" characters, regardless of the possible existence of intermediate types. It depends entirely upon the "scientific tact" of the investigator

---

[1]) Cf., e. g., Kluyver, A. J., The chemical activities of microorganisms. London 1931.

[2]) Benecke, W., Bau und Leben der Bakterien. Leipzig u. Berlin 1912. S. 212.

which characters will be deemed worthy of the designation "sufficiently fundamental"[1]).

It is here the place to give a short survey of the characters which may be taken into consideration in this respect.

a) Morphological characters. It is self-evident that the shape of the cells is of outstanding importance for determining the place of a bacterium in any phylogenetic system. The same holds, of course, for the mode of reproduction and the occurrence of special resistent stages such as endospores, gonidia etc. In addition to these characters the size and the structure of the cells may give valuable indications.

With regard to structure it is especially the presence of organs for locomotion, flagella, and the way in which they are attached to the cell which has long been recognized as affording insight in mutual relationships. In this connection it must, however, be remarked that experience has taught that in cases of immotility of the cells we have to discriminate between "incidental" and "genuine" immotility. For, as has been emphasized by Orla-Jensen, we sometimes meet with immotile species which unquestionably are closely related to motile ones, whereas, on the other hand, one is struck by the fact that in several large natural groups motility is completely lacking.

Finally one diagnostic character of wide application, viz. the Gram stain, may also be considered as dependent on structural properties of the cell and the many instances of a close correlation of the outcome of the Gram test with several other characters leave no doubt as to its significance also for taxonomic purposes.

b) Physiological characters. The behaviour of the various bacteria in relation to temperature and osmotic pressure of the environment has often been used in the characterization of species. Recent investigations tend to throw doubt upon the soundness of this procedure, because of the wide range of adaptation which is manifested by most bacteria.

As has already been set forth the physiological characters of prime importance are those which are connected with the metabolism of the organism. Although in this respect the significance of the katabolic properties of the cells has been rightly stressed, yet one should not lose sight of the fact that in some cases the occurrence of special products of anabolism can also be made use of.

A first division of katabolic activity has to be made according to the source of the energy required by the cell. Here we must distinguish between the organisms capable of utilizing radiant energy and those which are dependent upon the chemical energy supplied by one or more constituents of the medium. In the latter case, which is the more common with bacteria, a further subdivision imposes itself according to the role of the free oxygen in katabolism. Firstly we find bacteria in which this gas is as indispensable as it is for higher plants and animals. But in addition to this category there exist organisms which can satisfy their energy requirements also in the absence of oxygen. Finally there is a third group of bacteria, which thrive only in its absence, or nearly complete absence.

[1]) It goes without saying that similar difficulties will also be encountered in marking off the higher systematic units, though to a lesser extent.

In each of these groups a further subdivision can be made both on the basis of the nature of the favoured katabolic substrates and on the basis of the mode of decomposition as evidenced by the nature of the final katabolic products. It may be added at once that this predilection for a special group of substrates — carbohydrates, protein decomposition products, or organates — involves a more or less pronounced adaptation to life in an environment of a special range of hydrogen ion concentration.

It must be pointed out, however, that a judicious selection of the criteria on which the above mentioned subdivision should be founded, is most essential. In this connection it cannot be sufficiently stressed that one should not confuse the physiological significance of the ability to derive energy from the desmolytic transformation of a special group of substrates with the ability to hydrolyze compounds of a complex nature, like proteins, polysaccharides, fats etc. For, to cite an example, it must be clear that there exists a far more fundamental difference between an organism which splits glucose into lactic acid and a second organism which produces out of the same substrate butyric and acetic acid, carbon dioxide and hydrogen, than between two lactic acid bacteria only one of which attacks maltose. In the latter case both organisms derive their energy from the same conversion of glucose into lactic acid, the hydrolysis of the maltose into glucose being only an introductory act devoid of any energetic significance. Hence differences in the hydrolytic capacity should never be applied for distinguishing systematic groups, they can merely be taken into account for the differentation of species.

The neglect of this point of view is undoubtedly responsible for the dislike with which morphologically inclined taxonomists view the application of physiological characters for the delimitation of systematic units larger than species.

Finally some remarks should be made regarding a physiological character of rather wide application in present day taxonomy, viz. pathogenicity. This appears to be a character of very doubtful value. For the case is not rare that a pathogenic organism is so closely related to a non-pathogenic one that the two are undistinguishable except with the aid of infection experiments. The creation of separate genera on the basis of such a character is objectionable, because this implies that even the generic nature of an organism cannot be decided upon independently of a knowledge of its previous history. The same difficulty holds, albeit to a lesser extent, for a differentiation of species on the basis of pathogenicity[1]).

In summarizing the above it is tempting to conclude that on the one hand phylogeny has led to the origin of various morphological groups, whilst, on the other hand, an evolution in metabolic properties has occurred which together are responsible for the almost unlimited diversity of bacterial species. Before attempting to apply these principles in the construction of a system, we will first critically examine the more recent contributions to the classification of bacteria.

[1]) Cf. particularly the valuable remarks made by O. Rahn, Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 78. 1929. S. 1; Bd. 79. 1929. S. 321, and Stapp, C., Schizomycetes (Spaltpilze oder Bakterien) in: Sorauer, Handb. d. Pflanzenkrankh. Bd. 2. 1928. S. 1—295.

III. Critical examination of recent contributions to the classification of bacteria.

The large number of papers in which ideas on bacterial taxonomy are advanced makes an endeavour to give a moderately complete survey altogether impossible. Therefore we shall confine ourselves to a consideration of the more strictly taxonomic publications.

The system of Lehmann and Neumann, adapted to modern needs since its inception in 1896, may still lay claim to a serious consideration[1]). The outstanding feature, and at the same time the weakness of the system, is undoubtedly its simplicity. Although for the separation of the families of the Schizomycetales morphological characters are used exclusively, it would seem that a far better use could be made of such characters to express natural relationships. In this case the Desmobacteriaceae, which have nothing in common with the other five families, would have been set aside as a group equivalent to the orders of Schizomycetales and Actinomycetales. The same holds for the family of the Spirochaetaceae. The remaining four families seem at first sight acceptable as units resulting from a gross subdivision. Yet it appears from a closer inspection of the accepted genera that their grouping violates the principle of natural relationship in many respects. Thus one finds in the large, physiologically very heterogeneous, genus Bacterium organisms with polar flagella which are much more closely related to the family Spirillaceae than to the greater part of the other Bacterium species. Furthermore, the unmistakable relationship between the species of the genus Plocamobacterium with those of the Proactinomycetaceae is fully neglected, even to the extent of incorporating them in different orders. As regards the family of the Desmobacteriaceae its extremely heterogeneous nature should be emphasized. Apart from the fact that Lehmann and Neumann apologetically incorporate in this family several large groups of bacteria not possessing the diagnostic characters of the family (Thiobacillus species, purple sulphur bacteria, the coccoid iron bacteria described by Molisch, etc.) there is no doubt that the recognized genera: Beggiatoa, Leptothrix, Crenothrix, Cladothrix and Thiothrix show neither affinities to the remaining genera of the Schizomycetales nor to one another.

It is clearly evident that in proposing this family Lehmann and Neumann have more or less unconsciously used physiological characters. Obviously the main reason for uniting the organisms in question into one family is not so much their morphological similarity as the peculiarity of their metabolism.

The most outstanding contribution of the system of the German authors and the one which has found general recognition is undoubtedly the realization of the close affinities existing between the genuine Actinomycetes and the genera Corynebacterium and Mycobacterium.

A revolution in the principles of bacterial taxonomy was brought about in the years 1908 and 1909 by the appearance of Orla-Jensen's publications[2]). For the first time the classification of the bacteria was based

[1]) Lehmann, K. B. und Neumann, R., Bakteriologische Diagnostik. 2 Teile. 1896. 7. Aufl. 1926/27.

[2]) Orla-Jensen, S., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 22. 1908. S. 97; 1909. S. 305 and Bd. 24. 1909. S. 477.

mainly on the physiological characters. The idea underlying the proposed system is a phylogenetic one. A genealogy is developed as a result of considerations concerning the succession of physiological types in the course of the evolution of life on earth.

Migula's influence is observable in the emphasis placed on the significance of the difference in flagellation. The mode of insertion of the locomotive organs is used for the separation of the bacteria into two orders: the Cephalotrichinae and the Peritrichinae. A place was assigned to the immotile bacteria in either one of these orders on the basis of their physiological relationship to motile species.

In 1921 Orla-Jensen has returned to the subject in a paper[1]) in which he makes another eloquent plea for his main theses. With the exception of a few minor amendments the system as proposed in 1908 is maintained.

The system has the great merit that it is built upon a sound evaluation of what is fundamental in the various physiological characters as manifested by the value attached to the energetically important katabolic properties. Another meritorious feature of Orla-Jensen's system is the creation of several new genera for physiologically well defined groups, together with the introduction of a rational code of nomenclature for all genera, fully independently of the principle of priority.

On the other hand, it is not surprising that the manifest neglect of the importance of morphological characters other than the flagellation has given rise to severe criticism. Without entering into a discussion of the numerous objections raised, it may suffice to give here a few examples in which in consequence of this the principles of natural relationship have been violated. The place of the immotile groups in the system is not satisfactory. Here physiological characters, like special nitrogen requirements, have been decisive in the position of the genera Streptococcus, Caseobacterium, and Propionibacterium amongst the Peritrichinae, in the position of Mycomonas, Corynemonas and Actinomyces amongst the Cephalotrichinae. The reason for this is that Orla-Jensen has adopted the view that one and the same physiological evolution has occurred only once in phylogeny. The possibility is not considered that such an evolution may have taken place independently in various morphologically different groups.

Morphologically the three first mentioned genera show such close affinities to the genera Mycobacterium and Corynebacterium, that the grouping of these five genera in the two different orders is inacceptable. In addition the designation of the two last mentioned genera as Mycomonas and Corynemonas, thus suggesting a relationship between the representatives of these groups and the cephalotrichous genera, has its foundation exclusively in the oxidative character of their katabolism. Here again we encounter the idea that in determining the systematic position of a group metabolism dominates over morphology.

Another instance of artificial grouping is offered by the creation of the genus Carboxydomonas for the permanently immotile Bacillus oligocarbophilus discovered by Beijerinck and van Delden. The systematic position given to this organism by Orla-Jensen

[1]) Orla-Jensen, S., Journ. of Bact. Vol. 6. 1921. p. 263.

— also expressed in its new generic name — is merely based on the idea, that there is a close resemblance between the metabolism of the organism in question and that of the representatives of the genera Hydrogenomonas and Methanomonas. Morphologically, however, the species of the latter genera are so typically related to the Pseudomonas species and so distinctly different from B. oligocarbophilus that Orla-Jensen's classification has to be rejected.

In spite of the criticisms given we want to emphasize that in our opinion Orla-Jensen's contribution to systematics — the prominent place assigned to rightly evaluated physiological characters — marks a milestone in the development of bacterial taxonomy.

In their entirety Orla-Jensen's views have never been accepted. It is the merit of Buchanan to have advocated a system of classification in which a limited use has been made of Orla-Jensen's ideas. In subdividing the order of the Eubacteriales Buchanan recognizes one family exclusively on the basis of physiological characteristics. The autotrophic nitrifying bacteria which Orla-Jensen considered as representatives of the most primitive among micro-organisms were here united in the family Nitrobacteriaceae.

Buchanan's system was more or less the foundation of that which soon afterwards evolved out of the work of a committee appointed by the society of American Bacteriologists, of which Buchanan originally was a member. For a description of the development of the work of this committee we may refer to the data presented in Buchanan's most valuable, exhaustive monograph on bacterial systematics[1]). It may suffice to state that the results have ultimately been laid down in Bergey's well-known Manual of Determinative Bacteriology[2]). In the following discussion we will therefore limit ourselves to a criticism of the system as developed in the last edition of this book. As for the earlier editions we will only remark that in these — especially in the first one — the tentative character of the outlined system was duly emphasized in the preface. Gradually the attitude of the editing committee has, however, changed and has grown more and more self-confident, probably owing to the commercial success of the book. This should be regretted because the publication of this cooperative effort has led to an abundance of sound criticism which might have been usefully incorporated in later editions. By ignoring this criticism the benificial effect which might have resulted from the cooperative character of the work — the first formal cooperation in the history of bacterial taxonomy — has been more or less nullified.

The final outcome can best be described as a compromise between the most divergent ideas which have been expressed in the course of time. Anyone who has had the opportunity to peruse the book will have been struck by the fact that morphological, physiological, nomenclative, utilitarian, cultural and pathogenic properties have been used in the building up of the system in the most arbitrary way. The result is a complete lack of homology in the various groups, as has already been emphasized by Prévot (l. c.). In addition to this serious shortcoming an utter disregard for the significance of mutual relationships between natural groups is apparent.

In support of these statements the following instances may be cited.

---

[1]) Buchanan, R. E., General Systematic Bacteriology. Baltimore 1925.
[2]) 1st Ed. 1923; 2nd Ed. 1925; 3rd Ed. 1930; 4th Ed. 1934.

The first one of the five families of the order Eubacteriales, viz. the Nitrobacteriaceae, is a curious conglomerate of organisms the majority of which have nothing in common save the fact that the average — usually medically trained — bacteriologist is unfamiliar with them. Whereas Buchanan, in creating this family, clearly intended to separate the nitrifying bacteria with their remarkable autotrophic mode of life from those bacteria for which organic substances are a necessary prerequisite for their development, this principle was violated when the Committee included in this family organisms which "may use in their metabolism" also "simple carbon containing compounds". Apart from the question what one has to understand by the restriction "simple" it will suffice to remark that nearly all bacteria will answer this requirement. Nor can such a "simple" metabolism have been meant to be imperative since any bacteriologist acquainted with genera like Acetobacter and Rhizobium will cultivate representatives of the genera in media containing an abundance of complex organic compounds!

The next family, Coccaceae, shows a clear-cut example of lack of homology in its subdivision in genera. No argument whatever is advanced for the sudden use of the character of pigment formation in the demarcation of the genus Rhodococcus. This emphasis on the occurrence of a red pigment in representatives of this genus, although nothing is known about a possible metabolic significance of the pigment, is most astounding, since the occurrence of a yellow or even an orange pigment amongst members of the genus Micrococcus does not seem to offer any ground for separating these from the non-pigmented species.

Proceeding to the third family, Spirillaceae, we will only point out that here again we meet with an instance where the occurrence of a red pigment is not considered of sufficient importance to be used as a generic character, for Spirillum rubrum Esmarch is classified together with the colourless spirillae. Unfortunately in this case — and this in contrast what has been remarked regarding the Rhodococcus species — there would have been every reason for separating Sp. rubrum from the other species, because here the pigment fulfils a fundamental metabolic function, Sp. rubrum being a typical purple bacterium. A documentation of this insight is in this case quite superfluous since this opinion is fully shared by Bergey et al. as is proved by the fact that we meet with the same organism again in an entirely different order (!) as Rhodospirillum rubrum (Esmarch) Molisch.

The next family, Bacteriaceae, offers no end of examples of heterogeneity, arbitrariness, utilitarianism, and disregard for natural relationship. The subdivision of this family into its twelve tribes has obviously been dictated by the tendency to keep apart the bacteria of importance to the hygienist from all others. In the key to the tribes this is obtained by giving the attribute "pathogenic for animals" to the representatives of the former group. This leads to the remarkable situation that in this group of "pathogens" several utterly harmless organisms, like many Aerobacter and Alcaligenes species, are encountered. Apart from this lack in consistency, making the organisms in question fully indeterminable, no bacteriologist who isolates a bacterium from soil, water, dairy products etc. will ever be able to decide whether it belongs to the "would-be pathogens" of Bergey et al. Hence another group of organisms, like the Esche-

richia species, becomes in most cases also indeterminable. The attempt to reinforce the antithesis pathogenic—non-pathogenic by ascribing to the former group an optimum temperature of 37,5° C., against one of 30° C. or less to the latter group, shows the same lack of consistency as regards its practical application. Numerous are the instances in which species with low temperature optima are found in the so-called pathogenic group, whereas the authors also do not hesitate to include bacteria with a temperature optimum of 37° C. or even higher (Serratia spec., Lactobacillus sp.) in the saprophytic group. Moreover in the species diagnosis several organisms of this group are reported to be pathogenic or having the intestinal canal as their normal habitat!

If one now proceeds to the subdivision of the large group of saprophytes or plant parasites one is struck by the miscellany of characters which are used in the demarcation of the various tribes. One semi-morphological property, the outcome of the Gram-stain, is used; the other characteristics are all physiological and of a very dubious nature, such as the ability to grow either well or poorly on ordinary media, the ability to digest cellulose or not, etc. Attention should be drawn furthermore to the great importance attached to the character of pigment production. Whilst in genera like Spirillum, Propionibacterium, Mycobacterium the production of yellow, orange, brown and red pigments is not considered to be of sufficient importance for making generic distinctions, here a special tribe is created for uniting the pigmented forms which are then divided into four genera on the basis of the colour. The occurrence of yellow pigments which in the genus Micrococcus is deemed inessential is here raised to a character of generic rank (Flavobacterium). Not all bacteriologists will realize, moreover, that for the correct determination of the common fluorescents he must reject the designation of the pigment as yellow but characterize it as green or blue-green. If he succeeds in avoiding this pitfall he will still be lost in case he is dealing with one of the numerous representatives of the genus Phytomonas which also produce a fluorescent pigment. For it is impossible to arrive at the last mentioned genus without this time having designated the same colour as pale yellow!

The arbitrariness may have been sufficiently demonstrated by the foregoing examples. Yet it is worth-while to note two more instances which at the same time clearly show the lack of homology in the various systematic units. In the tribe Erwineae the two genera are distinguished by the mode of insertion of the flagella; on the contrary the genera Flavobacterium, Chromobacterium and Achromobacter contain organisms with polar as well as such with peritrichous flagella. The second instance is the arbitrary use of the character of the Gram-stain. It has been mentioned above that the main subdivision of the saprophytes is based on this property; on the other hand in the group of animal parasites we encounter Gram-positive and Gram-negative species within the same genus (cf. e. g. Alcaligenes, Bacteroides).

We shall not continue the detailed criticism of Bergey's classification of the Eubacteriales but only make a few remarks regarding the remaining orders, documenting our opinion that in these orders the same inconsistency, lack of homology etc. are to be found. The second order, Actinomycetales, owes its origin to the just evaluation by Lehmann and Neumann of the natural relationship between the Acti-

nomycetes and the bacteria of the genera Mycobacterium and Corynebacterium. The common characteristics of these groups are morphological and comprise positive Gram-stain, the lack of ability to form true endospores and permanent immobility. These properties are indeed included in the diagnosis of the order as outlined in Bergey's manual. It is therefore perplexing to find in the family Mycobacteriaceae Gram-negative as well as motile organisms. Any one isolating an organism answering the diagnostic requirements of the genera Mycoplana, Cellvibrio and Actinobacillus would not hesitate a moment to include his organism in the order of the Eubacteriales.

A similar example is furnished by the species Leptothrix hyalina which, although it is stated not to form a sheath, is incorporated in the order of the Chlamydobacteriales regardless of the fact that in the key to the orders the occurrence of a sheath is decisive for including the organism in the order in question.

As for the next order, Thiobacteriales, we will only state that here, in contradistinction to what holds for the foregoing orders, morphological characters are fully left out of consideration in delimiting the order. The essential metabolic function of the sulfur or (and) the photosynthetic activity with the aid of the bacteriopurpurin pigment complex serve to characterize the order. Considered from this point of view it is rather surprising that the genus Thiobacillus is not included in this group.

With these comments on one of the most widely used systems the deplorable present state of bacterial classification is sufficiently illustrated.

During the course of the development of the American system a number of important studies on bacterial taxonomy appeared. One of the most outstanding contributions to a solution of the problem is undoubtedly the paper by Pringsheim[1]). This publication contains several very sound general considerations on the principles of taxonomy with corresponding critical remarks on the previously proposed systems. We will confine ourselves to a brief review of the scheme as advocated by the author. Then we meet with a first subdivision of the bacteria into five orders, each one of which may be called homogeneous and homologous.

The principal feature of Pringsheim's subdivision of the first order, Eubacteriales, is unquestionably the fact that the usual, somewhat primitive, classification on the basis of spheres, rods and spirals is not strictly maintained inasmuch as the Spirillaceae also include the rod-shaped bacteria with polar flagella, i. e. the genus Pseudomonas Migula. The natural affinities of the representatives of this genus to those of the genus Vibrio, as already pointed out by Migula, is so unmistakable that this amendment must be considered a decided improvement. Following the order of the Eubacteriales we encounter the order of the Rhodobacteriales comprising the natural group of the photosynthetic purple bacteria in two suborders: the sulfur-containing and the sulfur-free species. The merit of the demarcation of this order as compared with that of the Thiobacteriales Buchanan is to be found in the fact that the colourless sulfur bacteria of the genera Beggiatoa, Thiothrix and Thioploca, which show so different natural affinities (colourless Cyanophyceae as rightly suggested by

[1]) Pringsheim, E. G., Lotos. Bd. 71. 1923. S. 357.

Pringsheim), are not mixed up with the purple bacteria. Characteristic for Pringsheim's order of the Mycobacteriales is that it is again restricted to the homogeneous group formed by the genera Corynebacterium, Mycobacterium and Actinomyces. Significant for an appreciation of the clear insight of the author is his suggestion that the rod-shaped lactic acid bacteria might also belong to this order. The fifth order of the Desmobacteriales needs no comment since Pringsheim himself stresses its provisional nature.

From all the systems of classification based mainly on the morphology of the organisms Pringsheim's scheme is the most satisfactory one, and it compares especially favourably with Enderlein's revolutionary attempt at classifying the bacteria according to principles of comparative morphology and ontogeny ("cyclogeny")[1]). This author rejects all previous attempts at classification because they are not based on a careful and thorough cytological study and from a theoretical standpoint his plea for attaching predominant importance to cytological and ontogenetic characters is very convincing. However, as pointed out earlier in this paper, our knowledge of characters of this kind is necessarily extremely limited and Enderlein's own contributions in this field do not change this situation to any appreciable extent. For it has escaped the attention of this zoologist that by far the greater part of the cytological details reported by him are theoretically undetectable since the dimensions of the structures described are below the limits of the resolving power of the microscope. This implies that most of the "life-cycles" which are at the basis of Enderlein's system are fully artificial[2]). However tempting the classification outlined may be at first sight (cf. e. g. the table on p. 236), its value must be judged from its results. A system which unites in one genus Proteus vulgaris and Lactobacillus Delbrücki, and assumes close relationships of these with Acetobacter, Rhizobium (all in one and the same subfamily of the Eisenbergiinae) and with Sclerothrix (Mycobacterium tuberculosis) and Corynebacterium by placing all these genera in one of the 15 families, condemns itself.

Janke, who in 1926 had already published a critical essay on the subject of bacterial systematics[3]), later developed a system which is clearly influenced by Enderlein's views[4]). It seems superfluous to give here a complete survey of Janke's system. We will only remark that we encounter in this system many well-known groups -- to which Janke assigns the rank of families — viz. Coccaceae, Bacillaceae, Bacteriaceae, Corynebacteriaceae, Spirillaceae, Spirochaetaceae, Desmobacteriaceae and Myxobacteriaceae. A discussion of the question whether the establishment of these units as families is more or less justified may be omitted here. Our remarks will be confined to the subdivision of the families. Janke's critical attitude towards the use of physiological characters for classificatory purposes leads him to restrict his genera to those groups which can be identified with the aid of morphological characters only. This means that e. g. in the family

[1]) Enderlein, G., Bakteriencyclogenie. Berlin-Leipzig 1925.
[2]) For sound ideas concerning the therm "life-cycle" the reader is referred to the note by Ch.-E. A. Winslow, Science. Vol. 81. 1935. p. 314.
[3]) Janke, A., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 66. 1926. S. 481.
[4]) Janke, A., Österr. Bot. Ztschr. Bd. 78. 1929. S. 97.

of the Bacillaceae the common aerobic and anaerobic sporeforming bacteria are united in the one genus Bacillus thus rejecting the genus Clostridium of various older systems. Moreover, many bacteriologists will be shocked to meet with the genus Azotobacter in this family. The justification of this procedure is found in the statement: "Sporenbildende Stäbchen gehören zum Entwicklungskreis (Löhnis)". The rather doubtful observations of Löhnis have, however, never been corroborated. It is also worth mentioning that the external morphology which is responsible for the maintenance of a separate genus Azotobacter in Janke's system is frequently nearly duplicated in species closely related to Bacillus megaterium[1]) which is accepted by this author as a type species for a subgroup of the genus Bacillus.

The trend of thought mentioned above also accounts for the occurrence of only two genera, Bacterium and Fusiformis, in the family Bacteriaceae. The weakness of Janke's principles of classification is clearly evidenced by the heterogeneity of the genus Bacterium. The diversity of organisms collected by Enderlein in the subfamily of the Eisenbergiinae — which has already been criticized above — is found here in one and the same division of the genus Bacterium.

The 10 contributions by Rahn and collaborators[2]) to the classification of bacteria will be mentioned here firstly for their very sound, meritorious criticisms of Bergey's system. For these we refer to the original papers and we will only remark that it is most discouraging that since their publication two new editions of Bergey's manual have appeared from which it is evident that the editing committee did not pay any heed to Rahn's amply documented considerations. In addition to calling attention to various fallacies in Bergey's system Rahn has also given a number of constructive suggestions, the most important of which will be briefly reviewed here. In the first place Rahn and Laubengeyer point out the close relationship between several of the Bacteroides species and the Lactobacilli and propose to abandon the illdefined genus by incorporating these species in the genus Lactobacillus, whilst grouping the remaining quite dissimilar species with some other genera. Rahn and Mansfield then show the desirability and the feasability of collecting all polar flagellates out of the family of the Bacteriaceae into a separate family Pseudomonadaceae as had already been proposed by Winslow et al. in 1917. Finally there is a plea by Rahn for a due recognition of the intimate relation between the Streptococci and the natural group of the rod-shaped lactic acid bacteria. Rahn goes so far as to advocate the removal of the tribe Streptococceae from the family of the Coccaceae and its inclusion in the Bacteriaceae.

The most elaborate effort to revolutionize bacterial taxonomy in later years is undoubtedly the monograph published by Pribram[3]) in 1933, an extension of the ideas expressed in an earlier paper[4]). The most radical

---

[1]) Dianowa, E. W. und Woroschilowa, A. A., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 84. 1931. S. 433.

[2]) Rahn, O., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 78. 1929. S. 1; Bd. 79. 1929. S. 321; Rahn, O., Laubengeyer, E. und Mansfield, H. L., ebenda Bd. 79. 1929. S. 338.

[3]) Pribram, E., Klassifikation der Schizomyceten. Leipzig u. Wien 1933.

[4]) Pribram, E., Journ. of Bact. Vol. 18. 1929. p. 361.

principle introduced is the division of the bacteria into three subclasses which are based chiefly on ecological considerations. Thus the subclass Algobacteria is meant to comprise all the forms adapted to a life in water, as evidenced a. o. by the motility with the aid of polar flagella. The second subclass, Eubacteria, is made up of those bacteria whose habitat is the animal body or complex waste products of plant or animal origin. This habitat has led to forms which are either immotile or motile by means of peritrichous flagella and which are characterized by their ability to attack complex molecules. Finally the third subclass, Mycobacteria, is adapted to a life in soil and shows a distinct tendency to differentiation as manifested by the occurrence of spore formation, branching, etc.

Now the foundation of a classification chiefly on ecologic principles is undoubtedly very dangerous, as is clearly demonstrated by the obvious impossibility to apply such a scheme to the classification of higher organisms, where a more scientific taxonomy can be achieved on the basis of characters which have an undisputably phylogenetic value. It is therefore not surprising that a closer inspection of Pribram's system reveals its inadequacy. Thus, in order to defend the motility of a bacterium as a typical feature of an aquatic habitat Pribram has to resort to the enormity that the occurrence of peritrichous flagella amongst the representatives of the third group does not conflict with their supposed "sessile" character, since here the flagella do not serve the purpose of locomotion but just act as organs to replenish the food supply![1])

Moreover we find amongst the Algobacteria numerous species which are immotile, as well as organisms like various Micrococcus and Sarcina species which according to their habitat belong to the second subclass. And how can the author justify the inclusion of the peritrichous genera Serratia (and Hillhousia?) in the first subclass? The same holds, although for different reasons, for the genera Myxococcus, Chondromyces and Polyangium. The dissemination of a natural group like the Thiorhodaceae over three orders should not remain without protest and no investigator of this group of organisms will tolerate the placing of Rhabdomonas (N. B. as type genus) between the genera Beggiatoa and Thioploca and this merely on the basis of an alleged contractility of the cells.

Our criticisms of the second subclass are based for the greater part on the extreme heterogeneity of its constituent units. As for the second family our objections are substantially the same as those which have been brought forward in connection with our review of Enderlein's subfamily of the Eisenbergiinae. We might remark in this connection that all motile acetic acid bacteria (Ulvina spec.) which have been studied with respect to the mode of insertion of flagella have proved to be polar. In consequence their inclusion in the subclass Eubacteria conflicts with the first mentioned character in the diagnosis of this group. The objections raised by Rahn with respect to the genus Bacteroides apply also to the third family Bacteroidaceae.

The attempt to unite in one subclass those bacteria which show a ten-

---

[1]) We have found the same critical remark in the attractive review of Pribram's monograph by C. Stapp, Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 89. 1934. S. 514.

dency towards modes of reproduction other than fission is not objectionable in itself. However, the marked differences between the two orders makes it preferable to look upon these subgroups as terminal stages in the development of entirely different morphological groups and therefore, in our opinion, they should be ranged separately with their simpler ancestries. The advisability of the addition of several Gram negative genera to the otherwise well characterized group of the Mycobacteriales seems also questionable.

The preceding remarks will suffice to make it clear that, although Pribram's genera are homogeneous and much better characterized than many of the genera adopted by Bergey et al., we cannot approve of the way in which they are arranged in larger units. Which factors can be made responsible for this difference in appreciation? There can be no doubt that this is chiefly due to a different evaluation of the importance of various characters. Although Pribram pretends to attach a distinct value to the type of flagellation, yet the exceptions he allows in the consistent application of this diagnostic character are so numerous that already on this account a great deal of confusion results. Pribram's neglect of the suggestion made by Orla-Jensen that one should discern between "incidental" and "genuine" immotility — as discussed earlier — is another disturbing factor. Finally it is the insufficient appreciation of the importance of the Gram reaction which should be criticized. On the one hand Pribram fully recognizes the value of this character which even accounts for the creation of several new genera. On the other hand the author fails to realize the obvious mutual affinities between many of the Gram positive and many of the Gram negative genera respectively. Perhaps it is more correct to say that these mutual relationships do not fully escape the attention of the author, since in various places mention is made of the fact that certain species may be considered as connecting links between two often widely separated groups. Our principal grievance against Pribram's classification is that such considerations have remained without any influence on the final form of his system.

The last contribution to bacterial classification is the important paper by Prévot[1]) which has already been quoted. This study is especially attractive because the author starts with a clear formulation of the rules, principles and laws which, according to his insight, should govern bacterial systematics.

Prévot's first law states that the general morphology enables one to divide the bacterial kingdom in classes and these in orders. As classes Prévot recognizes the six orders previously established by Buchanan and a preliminary attempt is made at subdividing the first class (Eubacteriales) in five orders which apparently correspond to the five families of the American system. There is, however, the important difference that Prévot envisages the possibility of demarcating the Nitrobacteriaceae on the basis of an ellipsoidal cell form. Apart from the fact that our criticism of the said family as defined in the American system is not obviated by Prévot's redefinition, it seems to us very doubtful whether a distinction between two groups of the fundamental significance of an order can be founded on the difference between an ellipsoidal and a

---

[1]) Prévot, A. R., Ann. d. Sci. nat. Bot. 10me sér. Vol. 15. 1933. p. 23.

cylindrical cell shape. The failure of such a procedure is obvious if it is remembered that some of the most typical representatives of the Bacteriaceae have originally been described as Micrococcus species (Micrococcus prodigiosus, etc.). The ambiguity of the said character has, already a long time ago, led to abandoning Cohn's differentiation of the genera Bacterium and Bacillus on the basis of the length of the rods.

We can pass the second law in silence. As for the third law we welcome the stress laid on the importance of the Gram stain, especially since good arguments are given for the view that the outcome of this staining reaction depends on structural characters. The homogeneity of a family in this respect is required by Prévot.

The fourth law formulates that more special morphological properties (flagella, capsules, biometrical constants) have a generic value. Why the use of these features should be restricted to these smaller groups is not clearly stated, however. To us this limitation does not seem justified particularly with reference to the flagellation.

The remaining laws do not invite further comments; we only refer to our opposition to the sixth law in which Prévot restricts the use of physiological characters to the delimitation of species.

Prévot has confined himself to apply the above-mentioned principles to the elaboration of a detailed classification of the Coccaceae. The outstanding feature of his system as compared with previous ones is the early separation of the Gram negative and the Gram positive cocci, which ultimately leads to the creation of the new Gram negative genus Veillonella which is the counterpart of the Gram positive genus Micrococcus. In consequence of this the final system has the great merit of a logical and consistent structure. It should, however, be questioned whether it is commendable to restrict the physiological characters to specific delimitation. We can agree with the author that "aerobic" and "anaerobic" mode of life as based solely on the sensitivity of the organism towards free oxygen is a rather dangerous character. Yet it seems to us that the katabolic nature of the organism is a much more essential property and should not have been left out of consideration in the demarcation of higher groups than species. For it can hardly be doubted that the relationship between aerobic Micrococcus species and aerobic Sarcina species is at least as close as that between the latter and the anaerobic Sarcina species such as Zymosarcina ventriculi (Goodsir) Smit[1]).

IV. Outline of a rational system for bacterial classification on the basis of our present knowledge.

The preceding pages have not only served the purpose of exposing the manifold weaknesses and inconsistencies of the more recent systems, they may also perform the function of illustrating the considerations to which the general principles laid down in Section II lead in concrete instances. Therefore in the following attempt at sketching an outline of a rational bacterial system we shall also draw upon material which has already been used in the discussion of our attitude towards previous classifications.

[1]) Smit, Jan, Die Gärungssarcinen. Jena 1930.

It may be recalled that in the foregoing we have had the opportunity to point out that the assumption of both a morphological and a physiological evolution seems justified. A true reconstruction of the course of evolution is the ideal of every taxonomist. But, as has been rightly emphasized by Pringsheim, such a reconstruction is not feasible, firstly because the accepted relationships remain conjectural, and secondly because a number of the connecting links will be missing in the bacterial kingdom as it exists to-day. With Pringsheim we are of the opinion that "ein wirklich wissenschaftliches System, das also mit Kritik aufgestellt wäre, gar nichts anderes tun könnte, als zu versuchen, alle gegenseitigen Beziehungen der Organismen, die auf irgendeine Verwandtschaft hindeuten, wiederzugeben".

The practical application of this line of thought obliges us to face the question whether in the construction of the system morphological or physiological characters should have priority in the expression of relationships between those systematic groups which are no longer morphologically and physiologically homogeneous.

In our opinion the binomial nature of nomenclature accentuates the demand that genera be systematic units which are characterized as well by a more or less complete morphological homogeneity as by a fundamental agreement in metabolic properties. This means, of course, that for the distinction of species within a genus only characters of secondary importance, such as biometric constants, hydrolytic abilities, the occurrence of pigments not determining the metabolic type, etc. can be applied.

Consequently the question raised above must be answered in order to make possible an arrangement of the genera in such a way as to satisfy best the natural relationships existing between them.

We have decided upon the use of morphological criteria as main guiding principle in the creation of systematic units above the rank of genera. In doing so we are fully aware that this choice may appear arbitrary. The resulting system unintentionally suggests that a morphological evolution has been primary and that in the various stages of morphological development an independent, though sometimes parallel, physiological differentiation has occurred afterwards. Yet it does not seem excluded at all that in special cases the order of events has been the reverse and that in reality parallel morphological evolutions have taken place in two physiologically different groups.

There is, however, only a limited number of examples in which morphological differentiation in a clearly defined physiological group strongly suggests itself, whereas the instances are numerous that a typical katabolic process is found in groups morphologically so unrelated that affinities on the basis of physiology seem fully incompatible with the evolutionary idea. Moreover, in the former case the range of morphological differentiation extends but over a small number of closely related morphological units, as is e. g. clearly shown by the groups of purple bacteria. Therefore in a mainly morphological system such physiologically related groups will remain together, whilst, on the other hand, in a mainly physiological system morphologically related groups will be widely dispersed.

Guided by these general considerations we shall first of all give a survey of the morphological units which can be distinguished in the bacterial kingdom and of the way in which they seem to be mutually related. This will

be followed by the differentiation of the morphologically homogeneous groups on the basis of katabolism.

It seems acceptable that the diversity of bacterial forms is the outcome of various independent morphological evolutions which have had their starting-point in the simplest form both existent and conceivable: the sphere.

The existing forms suggest that four such evolutionary lines have to be distinguished.

a. In the first place we can observe that certain bacteria in which the spherical form is still fully maintained display a tendency to form complexes of a more or less regular appearance. Whereas little significance can be attached to the diplococcus form since its occurrence is inevitable in the reproduction process of the coccus, the formation of chains of four or more cocci is typical for several species. Obviously in this case one direction is preferential in cell division, the causative polarity becoming manifest owing to the fact that the cells remain attached.

In those spherical bacteria in which division takes place in two directions which meet at right angles complexes may originate which possess the typical form of tetrads or tetracocci. If finally the division occurs in three directions of space the outcome may be the formation of regular packets or sarcinae.

It must be emphasized, however, that the mentioned morphological groups comprise several transitional forms so that their delimitation, although desirable, is subject to many difficulties.

The occurrence of both Gram positive and Gram negative representatives among the coccoid forms indicates a micromorphological evolution which, although its direction cannot be traced, justifies a differentiation according to this character.

The highest developmental stage in the group of spherical organisms is in all probability displaid by the cocci able to form endospores, the existence of which has recently been firmly established by an investigation of Gibson[1]).

b. Motility occurs only sporadically among the cocci, yet it indicates that also the flagellated rods find their origin in this primitive group, the more so since the two typical modes of flagellation are already encountered.

It seems only logical that the short Gram negative polarly flagellated rods, as for instance characteristic for the species of the genus Pseudomonas, owe their origin to a Gram negative monoflagellated coccus[2]). The polarity which arises from the attachment of a single flagellum to the sphere may easily induce a polar deviation in the form of the bacterium. In an analogous way the type of motility characteristic for polarly flagellated organisms, viz. the rotation of the cell according to its longitudinal axis, may well be responsible for a gradual deformation of the cell resulting in the comma or vibrio form. The numerous transitional forms between this morphological type and the spirillum forms leave no doubt as to the origin of the latter group.

c. The appearance of more than one flagella distributed over the surface of a coccus may well have been the starting-point for the development of

[1]) Gibson, T., Archiv f. Mikrobiol. Bd. 6. 1935. S. 73.

[2]) The same argumentation holds, of course, for the evolution of polarly flagellated Gram positive rods (the newly created genus Listerella) in relation to a motile Gram positive coccus.

motile rods with peritrichous flagella. As a result of this the representatives of the Gram negative colon group (in its widest sense) and of the Gram positive genus Kurthia would have arisen. It lies at hand that the endospore forming rods with peritrichous flagella represent a higher stage of development of these groups.

d. The fourth line of morphological evolution of the spherical cells seems to lead via the streptococci to the short Gram positive rods in the group of lactic acid bacteria and corynebacteria. The further development of these universally immotile bacteria can have given rise to the mycobacteria which apparently form the connecting link with the simpler actinomycetes.

The various stages of these four independent evolutionary trends are represented in the following diagram (Fig. 1):

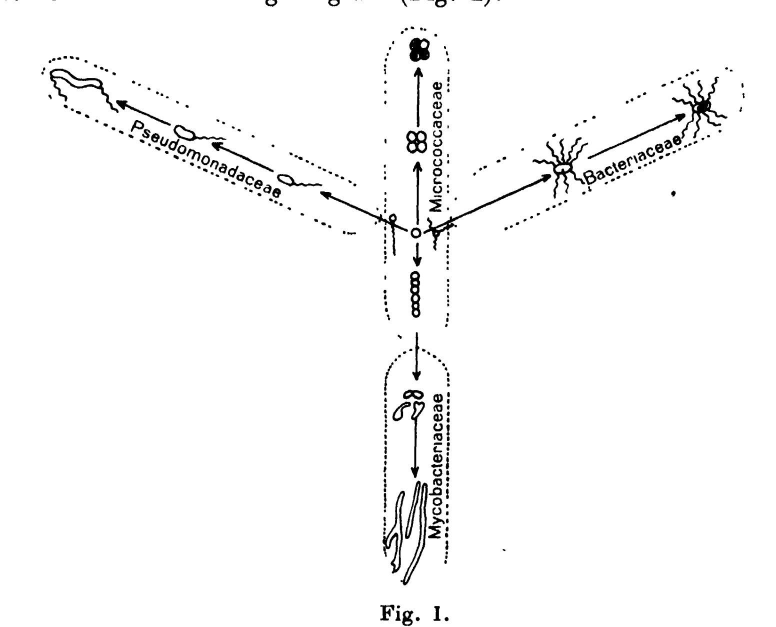


Fig. 1.

It appears appropriate to assign the rank of a family to each one of the four domains described and the names Micrococcaceae, Pseudomonadaceae, Bacteriaceae and Mycobacteriaceae are indicated.

The various morphological groups distinguished in each family will be designated as tribes. In accordance herewith the following tribes will be recognized:

Family	Tribes
Micrococcaceae	Micrococceae Streptococceae Sarcineae Sporosarcineae
Pseudomonadaceae	Pseudomonadeae Vibrioneae Spirilleae
Bacteriaceae	Bacterieae Bacilleae
Mycobacteriaceae	Corynebacterieae Mycobacterieae

Next we have listed the known, well distinguishable types of katabolism and so classified the bacteria answering the morphological requirements of the tribe according to their characteristic type of katabolism. As has already been argued organisms which on the basis of this procedure are collected in one and the same group should together constitute a genus.

In several instances this classification does not involve any difficulty, because the energetic requirements of many bacteria can be met by only one type of katabolic reaction. There are, however, also numerous cases in which it is clear that the organism can derive its energy from two or even more clearly distinct types of katabolism. This holds e. g. for the so-called facultatively anaerobic bacteria which in the presence of air are characterized by an oxidative katabolism (respiration), but which, under anaerobic conditions, depend upon some special type of fermentation. In those cases it is, of course, desirable to classify the organism in question according to its most characteristic type of katabolism, that is the type which permits the distinction from otherwise related organisms. This implies that for organisms capable of development under anaerobic conditions the katabolic process involved in this mode of life has been determinative, regardless of the question whether or not the organism also possesses a respiratory mechanism. If two different types of anaerobic katabolism, e. g. saccharolytic and proteolytic, are represented, the latter, as being the rarer, has been decisive.

In this way the system of classification represented in table 1 has been obtained.

The principles underlying this system would logically imply the creation of new generic names for all actually occurring combinations of fundamental morphological characters and special katabolic types. Experience shows, however, that in the majority of cases the natural groups obtained in this way coincide in all major points with various genera recognized in the systems now in use, at the same time demonstrating that our classificatory principles have, more or less unconsciously, already been applied by many of our predecessors. In all these cases we have, for practical reasons, maintained these current generic names, although naturally the generic diagnoses had to be amended more or less considerably.

In a few instances we have rejected a current generic name, although its diagnosis was sufficiently suited to justify its use. This was done because the generic name in question might give rise to confusion as a result of current nomenclature. Thus we have dropped the names Thiobacillus and Rhodobacillus, since these names wrongly suggest that they cover sporeforming bacteria. On analogous grounds we have used the generic name Sulfospirillum instead of Thiospira.

It is only self-evident that in a number of cases we have been obliged to establish new genera. The name Desulfovibrio for the sulfate reducing bacteria first described by Beijerinck and van Delden needs no further comment. Zymomonas has been chosen as a suitable name for polarly flagellated bacteria causing alcoholic fermentation like Pseudomonas Lindneri (Termobacterium mobile Lindner), Aeromonas for similar organisms which ferment sugars in a way probably closely related to the fermentation type characteristic of the genera Aerobacter and Aerobacillus. The genus Methanobacterium has been created for the methane producing rod-shaped bacteria

Table 1. The genera to be distinguished in the

	Cephalotrichous (and related immotile) rod-shaped bacteria. Fam. **Pseudomonadaceae**		
	Spiral cells (Tribe *Spirilleae*)	Curved rods (Tribe *Vibrioneae*)	Straight rods (Tribe *Pseudomonadeae*)
Photo-autotrophic:			
a. Bacteria with green pigment complex (Chlorobacteria)	—	—	—
b. Bacteria with purple pigment complex (Thiorhodaceae)	Thiospirillum	Chromatium	Thiothece
Photo-heterotrophic:			
a. Bacteria with brown pigment complex (Phaeobacteria)	Phaeospirillum	—	Phaeomonas
b. Bacteria with purple pigment complex (Athiorhodaceae)	Rhodospirillum	Rhodovibrio	Rhodomonas
Chemo-autotrophic:			
a. Bacteria which oxidize inorganic sulfur compounds (Leucothiobacteria)	Sulfospirillum	—	Sulfomonas
b. Bacteria which oxidize ferrous iron (and manganese)	—	Didymohelix ?	Sideromonas
c. Bacteria which oxidize ammonia	—	—	Nitrosomonas
d. Bacteria which oxidize nitrites	—	—	Nitrobacter
Chemo-heterotrophic:			
I. Bacteria with obligatory oxidative katabolism	Spirillum	Vibrio	Acetobacter Pseudomonas Rhizobium Azotobacter Listerella ?
II. Fermentative:			
a. "Mixed acid" fermentation	—	—	—
b. Symmetric dimethylglycol (2—3 butyleneglycol) fermentation	—	—	Aeromonas ?
c. Alcoholic fermentation	—	—	Zymomonas
d. Butyric acid (butylalcohol and acetone) fermentation	—	—	—
e. Protein fermentation	—	—	—
f. Propionic acid fermentation	—	—	—
g. Homofermentative lactic acid fermentation	—	—	—
h. Heterofermentative lactic acid fermentation	—	—	—
i. Sulfate reduction	—	Desulfovibrio	—
k. Methane fermentation (CO_2-reduction). .	—	—	Methanobacterium ?

various tribes on the basis of katabolic properties.

Spherical bacteria. Fam. **Micrococcaceae**				Permanently immotile rod-shaped bacteria. Fam. **Mycobacteriaceae**		Peritrichous (and related immotile) rod-shaped bacteria. Fam. **Bacteriaceae**	
Cells single or in irregular conglomerates (Tribe *Micrococceae*)	Cells in regular tetrads or packets (Tribe *Sarcineae*)	Cells in tetrads forming endospores (Tribe *Sporosarcineae*)	Cells in chains (Tribe *Streptococceae*)	Short rods (Tribe *Corynebacterieae*)	Long rods with a tendency to form filaments (Tribe *Mycobacterieae*)	Non-sporeforming rods (Tribe *Bacterieae*)	Sporeforming rods (Tribe *Bacilleae*)
Chlorobium	—	—	—	—	—	—	—
Thiopolycoccus	Thiopedia Thiosarcina	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—
Rhodococcus	—	—	—	—	—	—	—
Achromatium	—	—	—	—	—	—	—
Siderocapsa	—	—	—	—	—	—	—
Nitrosococcus	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—
Neisseria? Micrococcus	Gaffkya Sarcina	Sporosarcina	—	Corynebacterium	Mycobacterium	Kurthia Alcaligenes	Bacillus
—	—	—	—	—	—	Bacterium	
—	—	—	—	—	—	Aerobacter	Aerobacillus
—	Zymosarcina	—	—	—	—	—	Zymobacillus
—	Butyrisarcina	—	—	—	—	—	Clostridium
Veillonella Peptococcus	—	—	Peptostreptococcus	Fusiformis ?	—	—	Peptoclostridium
—	—	—	—	Propionibacterium	—	—	—
—	Pediococcus	—	Streptococcus	Streptobacterium	Thermobacterium	—	—
—	—	—	Betacoccus	Betabacterium	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—
Methanococcus	Methanosarcina	—	—	—	—	—	—

described by Söhngen[1]). Similarly Methanosarcina is a new generic name for the related sarcina, Methanococcus for the small spherical forms causing this type of fermentation[2]). Peptococcus and Peptostreptococcus represent the anaerobic proteolytic micrococci and streptococci respectively; Butyrisarcina has been adopted as a designation for the butyric acid producing Zymosarcina maxima (Lindner) Smit and possibly allied forms. Finally the name Zymobacillus has been introduced for the facultatively anaerobic sporeforming bacteria of the type Bacillus macerans Schardinger.

Provisionally, and with great reservation, we have added two genera, Phaeospirillum and Phaeomonas, for bacteria belonging to the group of organisms which Utermöhl has designated as Phaeobacteria[3]). These show very close affinities with the Athiorhodaceae, both morphologically and physiologically. It is entirely possible that a careful study of these brown bacteria will reveal facts which would justify their inclusion in the corresponding genera of the purple bacteria, Rhodospirillum and Rhodomonas.

In the composition of the table some difficulty was experienced, however, in view of the fact that for a few of the existing genera the katabolic properties are still insufficiently known. In some cases the relationships of such genera to organisms, whose position could be readily determined, were more or less evident, and therefore their place in the table has tentatively been indicated. This holds e. g. for the genera Aeromonas and Fusiformis. In other cases even such indications are lacking, and so a few genera well-known to the medical bacteriologist could not yet be classified. This applies e. g. to Pasteurella, Dialister, Haemophilus, Listerella and to the species Corynebacterium diphtheriae which, owing to its indubitable fermenting capacity, cannot be grouped with the obligatory oxidative saprophytic corynebacteria.

For analogous reasons, but now because of the scantiness of morphological data, the position of the genera Nitrobacter, Didymohelix, Sideromonas, Kurthia, and Methanobacterium must be deemed provisional.

The preliminary nature of the table manifests itself also by the circumstance that in a restricted number of cases it was considered desirable to maintain a number of genera which according to the principle adopted should have been amalgamated.

Because we have felt that there possibly exist sufficiently essential differences between such genera as Azotobacter, Acetobacter, Kurthia, and the genera with which they are grouped, we have refrained from rashly abolishing them, although the morphological differentiation which is at the basis of our system does not suffice to keep them separated. In some instances a separation is already fully justified on the basis of the outcome of the Gram stain. In this connection we refer to the genera Kurthia — Alcaligenes, and Listerella — Pseudomonas, the species of the first-mentioned genus of each couple being Gram positive, those of the second one Gram negative. We may trust, moreover, that future

[1]) Söhngen, N. L., Het ontstaan en verdwijnen van waterstof en methaan etc. Diss. Delft, 1906.
[2]) Groenewege, J., Bull. du Jardin Bot. Buitenzorg. Vol. 2. 1920. p. 203.
[3]) Utermöhl, H., Biolog. Zentralbl. Bd. 43. 1924. S. 605.

investigations will provide the means for a more adequate generic differentiation in the cases under discussion.

When we now proceed to an examination of the table as a whole, we must first of all realize that its two-dimensional nature evidently does not permit of a true representation of the natural relationships of the various genera. The postulated many-sided morphological evolution starting from the group of spherical organisms in reality asks for a grouping of the three families of rod-shaped organisms around that of the Micrococcaceae.

Notwithstanding this shortcoming of the table it is obvious that in many of the physiological groups distinguished the distribution of the genera is far from random, as a glance at the upper half of the table shows convincingly. Apparently there is a close correlation between the phototrophic and chemo-autotrophic modes of life and morphology. In this domain it is therefore rather inessential whether a physiological or a morphological evolution is assumed to have been primary. The mutual relationships remain clearly expressed in either case. Another physiological group, viz. that of the true lactic acid bacteria, also shows a definite correlation between physiological and morphological properties.

A further striking feature of the table is undoubtedly the occurrence of an obligatory oxidative metabolism in nearly all morphological types. Although this is partly due to the fact that in the present state of our knowledge it is impossible to carry through a subdivision of the aerobic metabolism into different types in a way comparable with that which has been applied in the case of fermentative metabolism, yet the table suggests that in the group of the obligatory oxidative heterotrophic bacteria the main morphological evolution has occurred. In this line of thought the physiological evolution will have taken place in the different stages of this primary development. In this connection it must be remembered that in several cases the fermentative metabolism is only a supplement to the oxidative mode of life. The assumption made would also account for the more or less haphazard distribution of the various katabolic types in the different morphological units.

A few words remain to be said with regard to the distribution of the Gram positive and Gram negative genera in the system. As has been remarked before we attach sufficient importance to this character to require that a genus be homogeneous in this respect. Yet it appears that the system given does not result in a clear-cut separation of the Gram positive and the Gram negative genera. For the family of the Micrococcaceae this differentiation has already been remarked upon. In the family of the Pseudomonadaceae Gram negative genera are strongly predominant, whereas on the contrary in the family of the Mycobacteriaceae only Gram positive organisms are encountered. Finally it does not seem excluded that in the family of the Bacteriaceae a parallel development has taken place in both Gram positive and Gram negative forms. If the reported occurrence of Gram negative Bacillus species should be confirmed a division of this genus will become inevitable which might lead to a clarification of the affinities in the family as a whole.

It will not have escaped attention that in the foregoing most "bacteria" which, already in previous systems, have been separated from the so-called Eubacteriales have been left out of consideration. This holds for the Spirochaetales, the Myxobacteriales, the Actino-

mycetales (p. p.) and the Chlamydobacteriales. The Thiobacteriales in the sense of Buchanan have been included with the exception of the genera Beggiatoa, Thiothrix and Thioploca. The representatives of the latter genera show such unmistakable morphological affinities with the Cyanophyceae that in our opinion they must be considered as colourless derivatives of the genera Oscillatoria, Phormidium and Schizothrix (see also Pringsheim l. c.).

As for the Spirochaetales and the Myxobacteriales they form well-defined groups whose affinities with the Eubacteriales are at least doubtful. Therefore they may well be ignored here. On the other hand the relationship of the Actinomycetes to the Eubacteriales is very clear; as is generally accepted they represent stages of higher development of the Myxobacterieae. At the same time they form such a special and extensive group by themselves that their classification falls outside the scope of this study.

The remaining order of the Chlamydobacteriales cannot so easily be disposed of. At first sight the representatives of genera like Leptothrix, Crenothrix and Sphaerotilus do not seem at all related to any of the Eubacteriales. Athough we cannot yet express any definite opinion regarding the taxonomy of this group it appears probable that it is very heterogeneous and that it harbours organisms (Crenothrix!) which are closely related or belong to the Eumycetes, as well as organisms which, like Sphaerotilus natans, are related to sheath-free filamentous Eubacteriales (Bacillus, Mycobacterium and Thermobacterium species). In this respect it is tempting to draw the attention on the one hand to such organisms as Leptothrix hyalina (Migula) Bergey et al. and Sphaerotilus paludosus Smit[1]) which, although they are usually reckoned to belong to the Chlamydobacteriales, are reported to lack a sheath, and on the other hand to a bacterium, like Bacillus funicularius, which, although a true Bacillus species, forms a distinct sheath under special nutritional conditions[2]). Moreover, the latter phenomenon is also frequently encountered in the group of the true lactic acid bacteria[3]).

Table II gives a survey of the families, tribes and genera of the order Eubacteriales. After all that has already been said this table will not need any further comment.

In concluding we wish to make the following remarks.

As has been amply set forth in the discussion of the general principles of classification it is necessary both from a scientific and from a practical standpoint to aim at a system which is worthy of the designation "natural". We fully realize that the result of our own classificatory attempt has only very imperfectly approximated this goal.

On the other hand it seems to us that the system as outlined in this paper marks a definite progress as compared with previous ones. To justify this statement it will suffice to bring out two features.

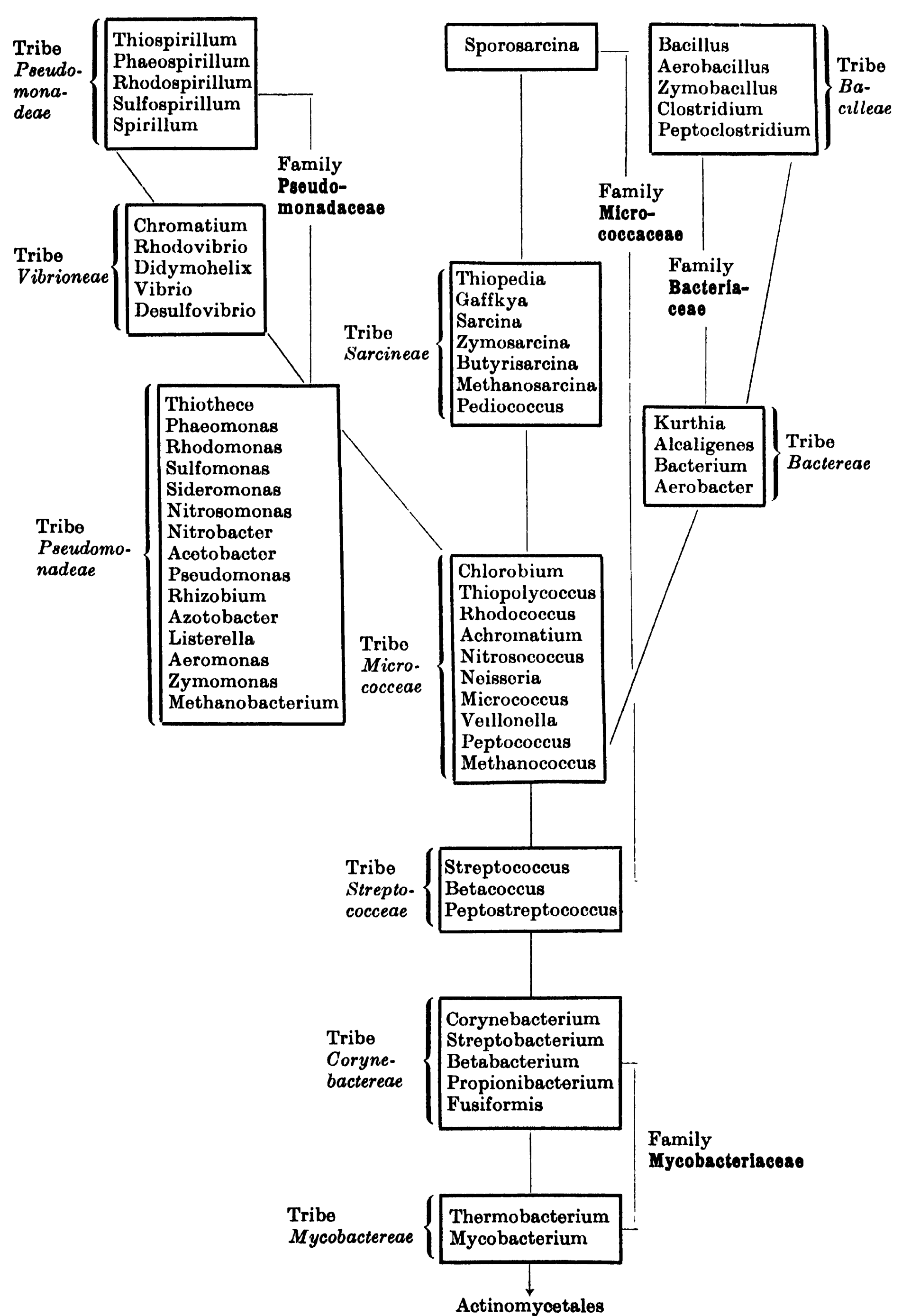
Firstly the system given is characterized by its simplicity as well as by its consistency. The principle that a genus in all cases is defined by the

---

[1]) Smit, Jan, Archiv f. Mikrobiol. Bd. 5. 1934. S. 550.
[2]) Kluyver, A. J., and Niel, C. B. van, Planta. Bd. 2. 1926. p. 507.
[3]) Cf. Orla-Jensen, S., The Lactic Acid Bacteria. Copenhague 1919.

Table 2.

The Families, Tribes, and Genera of the Eubacteriales.



fundamental morphological and katabolic properties makes for units which are much more easily distinguishable than the majority of the genera in the previous systems. In addition the system offers the advantage of permitting the ready incorporation of organisms with still unknown combinations of morphological and physiological characters. Therefore it may lay claim to the epithet "rational".

But secondly it seems to us that to a certain extent the system, although artificial, also answers the requirements of a true natural system. For the natural relationships between the various bacteria which in the present state of our knowledge can be vaguely perceived find a definite expression in the aspect of the system. That this aspect is not final is certain. Future investigations will deepen our insight into the natural relationships of different bacterial groups and the system will have to be modified accordingly.

Nevertheless it appears likely that the idea which is largely responsible for the outline, viz. the occurrence of both morphological and katabolic evolution in the bacterial kingdom, will reappear in future classifications, thus perhaps justifying the use of the word prospects in the title of this paper. In the meantime the system in its present imperfect shape may well serve the purpose of stimulating interest and research in this field.

Delft, January 1936.

Appendix.

List of genera included in the tables and their diagnosis[1])

I. **Tribe** Spirilleae.

1. Thiospirillum Winogradsky, 1888.

Spiral bacteria, motile by means of cephalotrichous flagella. No endospores formed. Photo-autotrophic, containing a red to purple pigment complex. Normally reducing carbon dioxide with the simultaneous oxidation of H_2S or other inorganic sulfur compounds.

The type species in Thiospirillum sanguineum (Ehrenberg) Winogradsky.

2. Phaeospirillum nov. gen.

Spiral bacteria, motile by means of cephalotrichous flagella. No endospores formed. Photo-heterotrophic, containing a brown pigment complex.

The type species to be assigned in the near future.

3. Rhodospirillum Molisch, 1907.

Spiral bacteria, motile by means of cephalotrichous flagella. No endospores formed. Photo-heterotrophic, containing a red to purple pigment complex.

The type species is Rhodospirillum rubrum (Esmarch) Molisch.

4. Sulfospirillum nov. gen. Syn.: Thiospira Wislouch, 1914.

Spiral bacteria, motile by means of cephalotrichous flagella. No endospores formed. Chemo-autotrophic, oxidizing H_2S or other inorganic sulfur compounds.

[1]) Although the diagnoses of those genera which have been retained from earlier systems of classification have nearly all been subject to more or less considerable amendments, we have indicated this only explicitly by the suffix "Emend." in those cases in which the amendment introduced involved the elimination of well established species from the genus.

Secondly it has to be emphasized that the following generic diagnoses have purposely been kept broad, although they might, in most cases, well have been elaborated on the basis of the available information concerning the representatives described until now. We have refrained from this in order to permit the future incorporation of species which deviate in minor respects from the collectivity now included in the genus, but which, nevertheless, show the morphological features of the tribe, and the katabolic activity deemed characteristic of the genus.

The type species is S u l f o s p i r i l l u m W i n o g r a d s k y i (Omelianski).

5. S p i r i l l u m Ehrenberg, 1830.

Spiral bacteria, motile by means of cephalotrichous flagella. No endospores formed. Chemo-heterotrophic, oxidizing various organic compounds. Gram negative.

The type species is S p i r i l l u m u n d u l a (Müller) Ehrenberg.

II. **Tribe** V i b r i o n e a e.

1. C h r o m a t i u m Perty, 1852.

Slightly curved rods, motile by means of cephalotrichous flagella. No endospores formed. Photo-autotrophic, containing a red to purple pigment complex. Normally reducing carbon dioxide with the simultaneous oxidation of H_2S or other inorganic sulfur compounds.

The type species is C h r o m a t i u m O k e n i i Perty.

2. R h o d o v i b r i o Molisch, 1907.

Slightly curved rods, motile by means of cephalotrichous flagella. No endospores formed. Photo-heterotrophic, containing a red to purple pigment complex.

The type species is R h o d o v i b r i o p a r v u s Molisch.

3. D i d y m o h e l i x Griffith, 1853. Syn.: G a l l i o n e l l a Ehrenberg, 1838.

Curved rods, motile (?). No endospores formed. Chemo-autotrophic, oxidizing ferrous iron. The ferric hydroxide is deposited in the form of a twisted band which carries the organism at the top.

The type species is D i d y m o h e l i x f e r r u g i n e a (Ehrenberg) Griffith.

4. V i b r i o Müller, 1773.

Curved rods, motile by means of cephalotrichous flagella. Occasionally spiral forms are present. No endospores formed. Chemo-heterotrophic, oxidizing various organic compounds. Gram negative.

The type species is V i b r i o c o m m a (Schroeter) Bergey et al.

5. D e s u l f o v i b r i o nov. gen.

Curved rods, motile by means of cephalotrichous flagella. Occasionally spiral forms are present. No endospores formed. Chemo-heterotrophic, anaerobic, oxidize organic substances with the simultaneous reduction of sulfate to sulfide.

The type species is D e s u l f o v i b r i o d e s u l f u r i c a n s (Beijerinck), Syn.: S p i r i l l u m d e s u l f u r i c a n s Beijerinck.

III. **Tribe** P s e u d o m o n a d e a e.

1. T h i o t h e c e Winogradsky, 1888[1]).

Ellipsoidal to rod-shaped bacteria, motile by means of cephalotrichous flagella. No endospores formed. Photo-autotrophic, containing a red to purple pigment complex. Normally reducing carbon dioxide with the simultaneous oxidation of H_2S or other inorganic sulfur compounds.

The type species is T h i o t h e c e g e l a t i n o s a Winogradsky.

2. P h a e o m o n a s nov. gen.

Ellipsoidal to rod-shaped bacteria, motile by means of cephalotrichous flagella. No endospores formed. Photo-heterotrophic, containing a brown pigment complex.

The type species is P h a e o m o n a s v a r i a n s (Ewart), Syn.: S t r e p t o c o c c u s v a r i a n s Ewart.

3. R h o d o m o n a s Orla-Jensen, 1909. Emend. (!)[2]). Syn.: R h o d o b a c i l l u s Molisch, 1907.

[1]) It seems highly doubtful whether the other genera created by W i n o g r a d s k y for similarly shaped organisms (T h i o c y s t i s, L a m p r o c y s t i s, A m o e b o b a c t e r, T h i o d i c t y o n) are sufficiently different to be maintained. Also various of the purple sulfur bacteria which have been described as C h r o m a t i u m species should be reckoned to T h i o t h e c e.

[2]) It has to be clearly understood that the diagnosis of this genus as given above is not at all in agreement with the diagnosis given by O r l a - J e n s e n who uses the name as a synonym for C h r o m a t i u m. Nevertheless, the name in question is adopted here to match the names of the related genera R h o d o s p i r i l l u m, R h o d o v i b r i o and R h o d o c o c c u s.

Ellipsoidal to rod-shaped bacteria, motile by means of cephalotrichous flagella. No endospores formed. Photo-heterotrophic, containing a red to purple pigment complex.

The type species is Rhodomonas palustris (Molisch), Syn.: Rhodobacillus palustris Molisch.

4. Sulfomonas nov. gen. Syn.: Thiobacillus Beijerinck, 1904.

Ellipsoidal to rod-shaped bacteria, motile by means of cephalotrichous flagella. No endospores formed. Chemo-autotrophic, oxidizing H_2S or other inorganic sulfur compounds.

The type species is Sulfomonas thiopara (Beijerinck), Syn.: Thiobacillus thioparus Beijerinck.

5. Sideromonas Cholodny, 1922.

Ellipsoidal to rod-shaped bacteria, immotile (?). No endospores formed. Chemo-autotrophic, oxidizing ferrous iron.

The type species is Sideromonas confervara Cholodny.

6. Nitrosomonas Winogradsky, 1892.

Ellipsoidal to rod-shaped bacteria, motile by means of cephalotrichous flagella. No endospores formed. Chemo-autotrophic, oxidizing ammonia to nitrite.

The type species is Nitrosomonas europaea Winogradsky.

7. Nitrobacter Winogradsky, 1892.

Ellipsoidal to rod-shaped bacteria, either immotile or motile by means of cephalotrichous flagella. No endospores formed. Chemo-autotrophic, oxidizing nitrite to nitrate.

The type species is Nitrobacter Winogradskyi Buchanan.

8. Acetobacter Beijerinck, 1900.

Ellipsoidal to rod-shaped bacteria, either immotile or motile by means of cephalotrichous flagella. No endospores formed. Chemo-heterotrophic, oxidizing various organic compounds, with a marked tendency to form acids as products of incomplete oxidation. Adapted to life in acid media.

The type species is Acetobacter Pasteurianum (Hansen) Beijerinck.

9. Pseudomonas Migula, 1894.

Ellipsoidal to rod-shaped bacteria, either immotile or motile by means of cephalotrichous flagella. No endospores formed. Chemo-heterotrophic, oxidizing various organic compounds. Gram-negative. Adapted to life in neutral to slightly alkaline media.

The type species is Pseudomonas fluorescens (Flügge) Migula.

10. Rhizobium Frank, 1889.

Ellipsoidal to rod-shaped bacteria, motile by means of cephalotrichous flagella. Branched and swollen involution forms. No endospores formed. Chemo-heterotrophic, oxidizing various organic compounds. The association of the bacteria and Leguminosae fixes atmospheric nitrogen (root-nodules!).

The type species is Rhizobium radicicola (Beijerinck).

11. Azotobacter Beijerinck, 1901.

Ellipsoidal to rod-shaped bacteria, motile by means of cephalotrichous flagella. No endospores formed. Chemo-heterotrophic, oxidizing various organic substances. Capable of fixing atmospheric nitrogen.

The type species is Azotobacter chroococcum Beijerinck.

12. Listerella Pirie, 1927.

Short rod-shaped bacteria, motile by means of cephalotrichous flagella. No endospores formed. Chemo-heterotrophic, oxidizing various organic compounds. Gram positive.

The type species is Listerella monocytogenes (Murray et al.) Pirie.

13. Aeromonas nov. gen.

Short rod-shaped bacteria, motile by means of cephalotrichous flagella. No endospores formed. Chemo-heterotrophic, oxidizing various organic compounds, and capable of fermenting carbohydrates with the production of carbon dioxide and hydrogen, and 2—3 butylene glycol (?). Gram negative.

The type species is Aeromonas liquefaciens (Beijerinck), Syn.: Aerobacter liquefaciens Beijerinck.

14. Zymomonas nov. gen.
Ellipsoidal to rod-shaped bacteria, motile by means of cephalotrichous flagella. No endospores formed. Chemo-heterotrophic, oxidizing various organic compounds, and capable of fermenting carbohydrates with the production of carbon dioxide, ethyl alcohol, and lactic acid. Gram negative.
The type species is Zymomonas mobile (Lindner), Syn.: Termobacterium mobile Lindner.

15. Methanobacterium nov. gen.
Straight or slightly bent rods, often united to bundles or long chains. Motility not observed. No endospores formed. Chemo-heterotrophic, anaerobic, fermenting various organic compounds with the formation of methane. Gram negative.
The type species to be described in the near future.

IV. **Tribe** Micrococceae.

1. Chlorobium Nadson, 1906.
Spherical cells with a tendency to the formation of chains, rods, and even filamentous forms, the latter sometimes wound in tight spirals. Motility has not been observed. No endospores formed. Photo-autotrophic, containing a green pigment complex. Reduce carbon dioxide with the simultaneous oxidation of H_2S to sulfur.
The type species is Chlorobium limicola Nadson.

2. Thiopolycoccus Winogradsky, 1888.
Spherical cells, usually occurring in irregular masses, motility has not been observed. No endospores formed. Photo-autotrophic, containing a red to purple pigment complex. Normally reducing carbon dioxide with the simultaneous oxidation of H_2S or other inorganic sulfur compounds.
The type species is Thiopolycoccus ruber Winogradsky.

3. Rhodococcus Molisch, 1907 (non Zopf).
Spherical cells, motility has not been observed. No endospores formed. Photo-heterotrophic, containing a red to purple pigment complex.
The type species is Rhodococcus capsulatus Molisch.

4. Achromatium Schewiakoff, 1893[1]).
Large spherical cells, motile (no flagella?). No endospores formed. Chemo-autotrophic, oxidizing H_2S or other inorganic sulfur compounds.
The type species is Achromatium oxaliferum Schewiakoff.

5. Siderocapsa Molisch, 1909.
Spherical cells, motility has not been observed. No endospores formed. Chemo-autotrophic, oxidizing ferrous iron.
The type species is Siderocapsa Treubii Molisch.

6. Nitrosococcus Winogradsky, 1892.
Spherical cells, motile by means of a single flagellum. No endospores formed. Chemo-autotrophic, oxidizing ammonia to nitrite.
The type species is Nitrosococcus nitrosus (Migula) Buchanan.

7. Neisseria Trevisan, 1885.
Spherical cells, normally occurring in flattened pairs, immotile. No endospores formed. Chemo-heterotrophic, oxidizing various organic compounds. Gram negative.
The type species is Neisseria gonorrhoeae Trevisan.

8. Micrococcus Cohn, 1872[2]).
Spherical cells, occurring, singly in pairs, or in irregular masses. Either motile or immotile. No endospores formed. Chemo-heterotrophic, oxidizing various organic compounds. Gram positive.
The type species is Micrococcus luteus (Schroeter) Cohn.

[1]) It seems probable that the organisms described as Hillhousia, Moderula, Thiophysa, and Thiovulum species belong to this genus.

[2]) There should, perhaps, be a genus containing Gram negative oxidative cocci in addition to the genus Neisseria, the more so since the katabolism of representatives of this genus is insufficiently known. Although Prévot (l. c.) is inclined to include also aerobic Gram negative species in his genus Veillonella, this generic name will be used by us to designate the corresponding anaerobic species only.

9. Veillonella Prévot, 1932. Emend.[1])
Spherical cells, motility has not been observed. No endospores formed. Chemo-heterotrophic, anaerobic, capable of fermenting protein decomposition products with the production of carbon dioxide, hydrogen, and other unknown products. Gram negative.
The type species is Veillonella parvula (Veillon et Zuber) Prévot.

10. Peptococcus nov. gen.[2])
Spherical cells, either immotile or motile. No endospores formed. Chemo-heterotrophic, anaerobic, capable of fermenting protein decomposition products. Gram positive.
The type species is Peptococcus niger (Hall).

11. Methanococcus nov. gen.
Spherical cells, occurring singly or in masses. Motility has not been observed. No endospores formed. Chemo-heterotrophic, anaerobic, fermenting various organic compounds with the formation of methane. Gram negative (?).
The type species to be assigned in the near future.

V. **Tribe** Sarcineae.

1. Thiopedia Winogradsky, 1888.
Spherical cells, occurring in regular tetrads which are often united to unicellular layers. Motility has not been observed. No endospores formed. Photo-autotrophic, containing a red to purple pigment complex. Normally reducing carbon dioxide with the simultaneous oxidation of H_2S or other inorganic sulfur compounds.
The type species is Thiopedia rosea Winogradsky.

2. Thiosarcina Winogradsky, 1888.
Spherical cells in regular packets. No endospores formed. Photo-autotrophic, containing a red to purple pigment complex. Normally reducing carbon dioxide with the simultaneous oxidation of H_2S or other inorganic sulfur compounds.
The type species is Thiosarcina rosea (Schroeter) Winogradsky.

3. Gaffkya Trevisan, 1885.
Spherical cells often occurring in regular tetrads. Motility has not been observed. No endospores formed. Chemo-heterotrophic, oxidizing various organic compounds. Gram positive.
The type species is Gaffkya tetragena (Gaffky) Trevisan.

4. Sarcina Goodsir, 1842.
Spherical cells, often occurring in regular packets. No endospores formed. Chemo-heterotrophic, oxidizing various organic compounds. Gram positive.
The type species is Sarcina lutea Schroeter.

5. Zymosarcina Smit, 1930.
Spherical cells, generally occurring in regular packets. No endospores formed. Chemo-heterotrophic, anaerobic, fermenting carbohydrates with the formation of ethyl alcohol and carbon dioxide. Gram positive.
The type species is Zymosarcina ventriculi (Goodsir) Smit.

6. Butyrisarcina nov. gen.
Spherical cells, generally occurring in regular packets. No endospores formed. Chemo-heterotrophic, anaerobic, fermenting carbohydrates chiefly with the formation of butyric and acetic acids, carbon dioxide and hydrogen. Gram positive.
The type species is Butyrisarcina maxima (Lindner).

7. Methanosarcina nov. gen.
Spherical cells, generally occurring in regular packets. No endospores formed. Chemo-heterotrophic, anaerobic, fermenting various organic substances with the formation of methane. Gram negative.
The type species is Methanosarcina methanica (Smit).

[1]) Cf. the previous note.

[2]) The various anaerobic, Gram positive cocci placed by Prévot (l. c.) in the genera Diplococcus, Gaffkya, Staphylococcus and Micrococcus might well be united in this genus, as long as further particulars regarding their katabolism are lacking.

VI. **Tribe** Sporosarcineae.

1. Sporosarcina Orla-Jensen, 1909.
   Spherical cells, generally occurring in regular tetrads or packets. Either motile or immotile. Endospores are formed. Chemo-heterotrophic, oxidizing various organic compounds. Gram negative.
   The type species is Sporosarcina ureae (Beijerinck).

VII. **Tribe** Streptococceae.

1. Peptostreptococcus nov. gen.
   Spherical cells, generally occurring in chains. Immotile. No endospores formed. Chemo-heterotrophic, anaerobic, capable of fermenting protein decomposition products with the formation of carbon dioxide, hydrogen, and other unknown products. Gram positive.
   The type species is Peptostreptococcus anaerobius (Krönig et Menge).
2. Streptococcus Rosenbach, 1884. Emend. Orla-Jensen, 1919.
   Spherical cells, generally occurring in chains. As a rule immotile. No endospores formed. Chemo-heterotrophic, fermenting carbohydrates with the practically exclusive formation of lactic acid. Gram positive.
   The type species is Streptococcus lactis (Lister) Löhnis.
3. Betacoccus Orla-Jensen, 1919.
   Spherical cells, generally occurring in chains. Immotile. No endospores formed. Chemo-heterotrophic, fermenting carbohydrates with the formation of lactic and acetic acid, ethyl alcohol and carbon dioxide. Gram positive.
   The type species is Betacoccus arabinosaceus Orla-Jensen.

VIII. **Tribe** Corynebacterieae.

1. Corynebacterium Lehmann et Neumann, 1896. Emend. (!).
   Cells ovoid to rod-shaped, the latter frequently swollen or branched. Immotile. No endospores formed. Chemo-heterotrophic, oxidizing various organic compounds. Gram positive.
   The type species is Corynebactorium pseudodiphtheriticum Lehmann et Neumann.
2. Fusiformis Hoelling, 1910. Emend. (!).
   Cells ovoid, frequently elongate and fusiform, filaments sometimes formed. Immotile. No endospores formed. Chemo-heterotrophic, fermenting protein decomposition products (?). Gram positive (?).
   The type species is Fusiformis dentium Hoelling.
3. Propionibacterium Orla-Jensen, 1909.
   Cells ovoid to rod-shaped, the latter frequently swollen or branched. Immotile. No endospores formed. Chemo-heterotrophic, fermenting carbohydrates with the formation of propionic acid as the main product. Gram positive.
   The type species is Propionibacterium Jensenii van Niel.
4. Streptobacterium Orla-Jensen, 1919.
   Cells ovoid to rod-shaped, frequently in chains. Immotile. No endospores formed. Chemo-heterotrophic, fermenting carbohydrates with the practically exclusive formation of lactic acid. Gram positive.
   The type species is Streptobacterium casei Orla-Jensen.
5. Betabacterium Orla-Jensen, 1919.
   Cells ovoid to rod-shaped, frequently in chains. Immotile. No endospores formed. Chemo-heterotrophic, fermenting carbohydrates with the formation of lactic and acetic acid, ethyl alcohol and carbon dioxide. Gram positive.
   The type species is Betabacterium breve Orla-Jensen.

IX. **Tribe** Mycobacterieae.

1. Mycobacterium Lehmann et Neumann, 1896.
   Rod-shaped bacteria, with a marked tendency to the formation of branched and filamentous cells. No endospores formed. Chemo-heterotrophic, oxidizing various organic compounds. Gram positive, acid-fast.
   The type species is Mycobacterium tuberculosis (Koch) Lehmann et Neumann.

2. Thermobacterium Orla-Jensen, 1919.

Rod-shaped bacteria, with a tendency to the formation of filamentous cells. No endospores formed. Chemo-heterotrophic, fermenting carbohydrates with the practically exclusive formation of lactic acid. Gram positive.

The type species is Thermobacterium cereale Orla-Jensen.

X. **Tribe** Bacterieae.

1. Kurthia Trevisan, 1885.

Rod-shaped bacteria, sometimes united in chains. Either immotile or motile by means of peritrichous flagella. No endospores formed. Chemo-heterotrophic, oxidizing various organic compounds. Gram positive.

The type species is Kurthia Zopfii (Kurth) Trevisan.

2. Alcaligenes Castellani et Chalmers, 1918[1]).

Rod-shaped bacteria. Either immotile or motile by means of peritrichous flagella. No endospores formed. Chemo-heterotrophic, oxidizing various organic compounds. Gram negative.

The type species is Alcaligenes faecalis Castellani et Chalmers.

3. Bacterium Ehrenberg, 1828. Emend. (!)[2]).

Rod-shaped bacteria. Either immotile or motile by means of peritrichous flagella. No endospores formed. Chemo-heterotrophic, oxidizing various organic compounds, and capable of fermenting carbohydrates with the formation of various organic acids, and usually hydrogen and carbon dioxide. No acetylmethylcarbinol formed. Gram negative.

The type species is Bacterium coli Escherich.

4. Aerobacter Beijerinck, 1900. Emend.[3]).

Rod-shaped bacteria. Either immotile or motile by means of peritrichous flagella. No endospores formed. Chemo-heterotrophic, oxidizing various organic compounds, and capable of fermenting carbohydrates, 2—3 butylene glycol being one of the main products. Acetylmethylcarbinol is formed. Gram negative.

The type species is Aerobacter aerogenes (Escherich) Beijerinck.

XI. **Tribe** Bacilleae.

1. Bacillus Cohn, 1872.

Rod-shaped bacteria, sometimes occurring in chains. Either immotile or motile by means of peritrichous flagella. Endospores formed. Chemo-heterotrophic, oxidizing various organic compounds. Gram positive.

The type species is Bacillus subtilis (Ehrenberg) Cohn.

2. Aerobacillus Donker, 1926. Emend. (!).

Rod-shaped bacteria. Either immotile or motile by means of peritrichous flagella. Endospores formed. Chemo-heterotrophic, oxidizing various organic componnds, and capable of fermenting carbohydrates, 2—3 butylene glycol and ethyl alcohol being the main products. Gram positive.

The type species is Aerobacillus polymyxa (Prazmowski) Donker.

3. Zymobacillus nov. gen.

Rod-shaped bacteria. Either immotile or motile by means of peritrichous flagella. Endospores formed. Chemo-heterotrophic, oxidizing various organic compounds, and capable of fermenting carbohydrates, ethyl alcohol, acetic acid and acetone being the main products. Gram positive.

The type species is Zymobacillus macerans (Schardinger).

[1]) Including the genus Brucella.

[2]) It should be well understood that in this genus are included the genera Proteus, Salmonella, Eberthella, and Shigella, which nowadays are frequently used. Although specialists dealing with this group may feel the need of further subdivision, yet it is inacceptable to us to differentiate genera on such trifling characters as are used in the current systems. Two organisms which ferment glucose in essentially the same way should not, in our opinion, be placed in separate genera, bceause one of them ferments (i. e. hydrolyzes!) also lactose. Nor should this be done because one of them splits formic acid into carbon dioxide and hydrogen, whereas the other does not (i. e. acid but no gas produced!).

[3]) Including the genera Serratia and Klebsiella.

4. Clostridium Prazmowski, 1880.
Rod-shaped bacteria, sometimes occurring in chains. Either immotile or motile by means of pertirichous flagella. Endospores formed, as a rule in typical clostridia or plectridia. Chemo-heterotrophic, anaerobic, fermenting carbohydrates with the formation of butyric and acetic acid, sometimes also of butyl alcohol and acetone. Gram positive.
The type species is Clostridium acetobutylicum Speakman.
5. Peptoclostridium Donker, 1926.
Rod-shaped bacteria, sometimes occurring in chains. Either immotile or motile by means of peritrichous flagella. Endospores formed, sometimes in typical clostridia or plectridia. Chemo-heterotrophic, anaerobic, capable of fermenting protein decomposition products with the formation of carbon dioxide, hydrogen and other unknown products. Gram positive.
The type species is Peptoclostridium putrificum (Bienstock) Donker.

Studies on the Availability of Nitrogen of the Organic Nitrogenous Manures.

I. Influence of carbohydrates on Nitrification.

[From the Bacteriological section, Imperial Institute of Agricultural Research, Pusa.]

By **M. S. Raju,**

Agricultural Research Institute, Coimbatore, India.

The carbohydrates, being the major constituents of the plant materials, can increase or decrease the rate of availability of organic nitrogen, depending upon their physiological activity, which may be direct or indirect. The literature cited here (10, 13, 16) shows that the depressing effect of carbohydrates observed on the availability of organic nitrogen was explained on purely direct physiological basis. The indirect action of the complex (sclerenchymatous, cuticularised or liquified). cell-walls in mechanically protecting the intracellular nitrogen against microbial decomposition did not hitherto receive any attention at all. The actual rôle played by the carbohydrates on the nitrification is very little understood.

The purpose of the present investigation was (1) to explain the relative availability of some of the organic nitrogenous manures on the basis of their carbohydrates constituents and (2) to increase their availability by controlling the following internal and external factors.

Internal factors:

(1) Influence of C : N ratio of the material on the nitrification.

(2) Mechanical resistance offered by the cell walls against the decomposition of intracellular nitrogen.

External factors:

(1) Preliminary fermentation of the material under aerobic conditions.

(2) Physiological function of varying amounts of different carbohydrates on the nitrification.

Historical.

Several workers (1 to 3, 6 to 11, 14, 15, 18, 21) have reported that the addition of pure carbohydrates to soils or to solutions in pure cultures depressed the accumulation of ammonia or nitrates. Lipman et al (14) observed that the yield of crops as well as the nitrogen recovered by them were less in the presence of carbohydrates. Hutchinson and Milligan (4) found that the availability of nitrogen from sunnhemp (Crotalaria juncea L.) plants was increased by aerobic fermentation. Hutchinson and Richards (5) showed that the rate of decomposition of carbonaceous material could be increased by the addition of available nitrogen. These results show the possibility of controlling the rate of availability of organic manures by carefully regulating the quality and quantity of their carbon and nitrogen.

Experimental.

The nature of Pusa soil used in these experiments was reported by Leather in detail (12). It is an alluvial soil and contains 30 to 40% of $CaCO_3$, 0.46% of organic carbon, 0.07% of total nitrogen and only 0.001% of available P_2O_5 (1% citric acid method) and only 0.0002% of nitric nitrogen.

The green manure crops were grown in plots for six weeks during June to July 1923. Only the fresh shoots after chopping to a length of ½ to 1 inch were used in the nitrification experiments and for CO_2 production, to supply 30 mgs. of nitrogen for 100 mgs. of Pusa soil. The moisture was maintained at 16%. The compost was bottled loosely in a wide mouthed bottle and covered with a card board and tied with a muslin. They were incubated at 30° C. The water lost by evaporation was recouped weekly. The samples were drawn every fortnight for the estimation of nitrates, nitrites and ammonia.

Methods.

Ammoniacal nitrogen: The ammoniacal nitrogen was estimated by taking 50 gms. of the compost, acidified with 5 c.c. of conc. HCl and added sufficient amount of distilled water to make up the total volume to 150 c.c. The mixture was allowed to settle, and 50 c.c. of the clear supernatent liquid was taken for distillation with an excess of freshly heated MgO into a known volume of standard sulphuric acid. The amount of ammoniacal nitrogen was calculated from the titration value.

Nitric nitrogen: One part of the compost was shaken for ½ hour with 3 parts of distilled water (including the moisture contained in the compost). A little amount of CaO was added to hasten the clarification of the liquid. The supernatent liquid was filtered through a dry filter. An aliquot part was taken for the estimation of nitrates according to the standard Phenol-di-sulphonic acid method with the aid of a tinctometer and the colour standards.

Nitrous nitrogen: An aliquot part, as for the estimation of nitric nitrogen, was taken for the colorimetric estimation of nitrous nitrogen according to Griess-Ilosvay method.

Total nitrogen: The total nitrogen was estimated by the usual Kjeldahl method.

Production of CO_2: The apparatus was fit up as shown in the fig. 1. The compost was placed in a Woulf bottle. Two litres of air, free from CO_2, were aspirated very slowly every day over the compost. The CO_2 evolved from the compost was traped by the standard Baryta water contained in the Pettenkoffer tube. The amount of CO_2 evolved was estimated by the back titration of the baryta water used with standard HCl using phenolphthalein as an indicator.

The effect of carbohydrates on the Nitrification and the Production of CO_2 from the Castor cake.

The experiments on the nitrification of castor cake (*Ricinus communis* L.) with and without the addition of 0.5%, 1.0% and 1.5% of cellulose, starch or dextrose in Pusa soil was started. The estimation of nitric and ammoniacal nitrogen was made every fortnight, but only the maximum per cent of nitrification was shown in table 1. The production of CO_2 from the castor cake in Pusa soil with and without 1% cellulose, starch and dextrose was estimated daily and the daily averages were given in table 1.

Table 1. Showing the Influence of Carbohydrates on the Nitrification and CO_2 production from the Castor cake.

Treatment	Incubation	Maximum Nitrification	Decrease over control	mgs. per day (Average of 11 days)	mgs. CO_2 increase over control
	Weeks	%	%	mgs.	mgs.
Castor cake alone	6	59.4	—	17.9	—
Castor cake + 0.5% dextrose .	8	44.6	14.8	—	—
Castor cake + 1.0% dextrose .	8	49.5	9.9	79.8	61.9
Nil 1.0% dextrose	—	—	—	30.4	—
Castor cake + 1.5% dextrose .	8	42.1	17.3	—	—
Castor cake + 0.5% starch . .	8	22.3	37.1	—	—
Castor cake + 1.0% starch . .	8	19.8	39.6	34.0	16.1
Nil 1.0% starch	—	—	—	22.6	—
Castor cake + 1.5% starch . .	10	29.7	29.7	—	—
Castor cake + 0.5% cellulose .	12	52.0	7.4	—	—
Castor cake + 1.0% cellulose .	16	34.7	24.7	22.4	4.5
Nil 1.0% cellulose	—	—	—	14.4	—
Castor cake + 1.5% cellulose .	10	29.7	29.7	—	—

The amount of ammoniacal nitrogen present in these composts at the end of two weeks of incubation was 6.6 mgs. in the absence of carbohydrates, whereas in the presence of cellulose, dextrose and starch it was 6.0—8.1 mgs., 2.9 to 5.0 mgs. and 1.7 to 5.9 mgs. respectively. The corresponding values for nitrous nitrogen were 0.7 mgs., 0.003 mgs., 0.003 to 0.008 mgs. and 0.002 to 0.008 mgs. respectively. These values were constant for a long period, hence further determinations were discontinued.

The results in table 1 show that the addition of the carbohydrates decreased the per cent of nitrification of castor cake and increased the production of CO_2 at all the concentrations used. The following was the descending order of the carbohydrates in decreasing the nitrification: starch, cellulose and dextrose. Whereas for the increase in the CO_2 production the order was dextrose, starch and cellulose. The increased production of CO_2 indicates an increase in microbial numbers and activity, which in its turn increases the demand for available nitrogen to synthesise the microbial protein. The depression of nitrification in the presence of carbohydrates may be due to the assimilation of nitrates and ammonia for the microbial growth, leaving behind only smaller amounts to accumulate (16, 14). In the earlier stage of decomposition the dextrose caused greater depression in the nitrification but in the later stages it tended to increase. The effect of starch on the nitrification seem to persist longer and the type of microorganisms which can decompose it are fewer. Ultimately its final by pro-

ducts of decomposition are same as that of dextrose. The continuous physiological activity of starch lasting for a longer time may partly be responsible for its worst effect on nitrification. Cellulose, being comparatively inactive, ranks second in its depressing effect. As there is no close correlation between the increase in the production of CO_2 and the decrease in nitrification of castor cake, the depressing effect of the carbohydrates cannot, however, be explained entirely on the basis of assimilation of NH_3 and NO_3 by the microorganisms.

Recently Waksman and Iyer (20) have suggested that the NH_2 group of the protein molecules forms a complex compound with the carbonyl group of the lignin of a ketonic or an aldehyde nature. This compound was found to be highly resistant to bacterial attack. It may be possible that starch and cellulose on decomposition give rise to aldehyde and ketonic compounds which may react with NH_2 groups of the castor cake and resist further bacterial decomposition.

The explanation of Kendall et al (loc. cit.) that the proteins are not attacked by bacteria in the presence dextrose, cannot by accepted since the basis of his conclusion in his earlier publication is the reduction in the NH_3 present and an increase in acidity. As pointed out by Raistrick and Clark (loc. cit.) the reduction of ammonia may be due to its assimilation by bacteria stimulated by the dextrose. He failed to offer a satisfactory explanation for the greater capacity of B. cloacae, B. pyocyaneus and B. paratyphosus 18 to break down proteins in the presence of dextrose (loc. cit.). In his experiments (loc. cit.) vibrio H-61, although failed to ferment the sugar, actually assimilated ammonia especially during the first few days of its incubation.

The effect of Fermented Carbohydrates on the Nitrification of oil cakes.

If the differences in the depression of nitrification in the presence of different carbohydrates were mainly due to their capacity to stimulate the growth of microorganisms, the differences should get narrowed down if the carbohydrates were fermented with the soil for sufficiently long time before the nitrogenous manure was added, since all the carbohydrates tend to leave behind approximately the same by-products on prolonged decomposition. To test this, 1% each of dextrose and starch and cellulose were composted with the Pusa soil. At the end of 10 weeks of incubation at 30° C, 30 mgs. of N as castor cake or groundnut cake (Arachis hypogeae L.) were added and continued the incubation as usual.

Table 2. Showing the influence of Fermented Carbohydrates on the Nitrification of oil cakes.

Treatment	Castor cake			Groundnut cake		
	Incubation	Maximum Nitrification	Decrease over Control	Incubation	Maximum Nitrification	Increase over Control
	Weeks	%	%	Weeks	%	%
Oil cake alone	6	59.4	—	2	39.6	—
Oil cake + 1% dextrose	4	26.1	33.3	12	57.3	17.7
Oil cake + 1% starch .	8	20.1	39.3	14	50.1	10.5
Oil cake + 1% cellulose .	6	23.8	35.6	16	48.2	8.6

The decrease in the nitrification of castor cake was higher with the fermented dextrose and cellulose than with the unfermented carbohydrates. The value was unchanged for starch. The nitrification of groundnut cake was however, increased to a remarkable extent, though the duration of incubation necessary was longer. The values were not very wide with different carbohydrates. The limiting factor for the nitrification of groundnut cake was probably the supply of available energy. These results support the view that the carbohydrates reduce the nitrification of organic nitrogen, if already rich in energy materials by increasing the demand for nitrogen assimilation by the microorganisms, but if the material is poor in supplying energy the addition of carbohydrates increases the nitrification.

The effect of the cell-wall material on the Nitrification of green manures.

The organic nitrogenous compounds of the tissues are present within the cell and are enclosed by a cell-wall of different chemical composition and permeability. The diffusion of the intra cellular material depends upon the permeability of its cell-wall. Unless the cell wall is ruptured or decomposed, the intra-cellular nitrogen cannot undergo nitrification. Although the proteolytic enzymes contained in the cell can cause within the cell certain amount of deaminization of the intra-cellular nitrogen, the by products, cannot diffuse through the complex cell-walls. The mechanical protection offered by the complex cell-walls is, therefore, a very important factor in determining the rate of availability of organic nitrogen. This factor was not previously recognised. The sunnhemp and dhaincha shoots contained sclerenchymatous and cuticularised or lignified cell-walls respectively which were probably responsible for their low availability. An attempt was made to increase their nitrifiability by disintegrating their cell-walls with certain chemicals. The shoots of six weeks old sunnhemp and dhaincha were cut into bits of ½ inch long and soaked in distilled water, 5% H_2SO_4 or 5% K_2CO_3 solution for 24 hours. They were washed well in running water to remove the last traces of the chemical and dried in the sun. The residue was analysed for total nitrogen. The loss of nitrogen and the nitrification of the residue were given in table 3.

Table 3. Showing the percentage Loss of Nitrogen and the Nitrification of the Residue of Sunnhemp and Dhaincha after chemical treatment.

Treatment	Sunnhemp			Dhaincha		
	Loss of nitrogen	Maximum nitrification	Decrease over control	Loss of nitrogen	Maximum nitrification	Increase over control
	%	%	%	%	%	%
Control	—	48.3	—	—	50.0	—
5% H_2SO_4	42	37.7	—10.6	35	60.0	10.0
5% K_2CO_3 . . .	20	60.0	11.7	33	55.0	5.0
Distilled water . .	19	47.7	— 0.6	34	50.0	Nil

The los of nitrogen was uniformly high in all the treatments with dhaincha, but the residual nitrogen nitrified better than the control when treated with 5% H_2SO_4 and K_2CO_3. The treatment of sunnhemp with 5% K_2CO_3

caused only half the loss of nitrogen caused by 5% H_2SO_4 and the residual nitrogen nitrified much better than the control. The treatment with distilled water resulted in an appreciable loss of nitrogen with no advantage in the nitrifying capacity of the residue. The acid treatment disintigrated the cuticularised cell-walls of dhaincha while the potassium carbonate corroded the sclerenchymatous cell-walls of sunnhemp, and improved the nitrifying capacity of the residual nitrogen. These chemicals must have also dissolved certain carbohydrates of the material as pointed out by the previous workers (17, 19) and reduced the direct physiological interference of the carbohydrates on nitrification of the green manure.

The effect of preliminary Fermentation on the Availability of organic Nitrogenous manures.

The following organic manures guar (*Cyamopsis psoraloides*, Dc.) dhaincha, sunnhemp, cowpea (*Vigna catjang*, Walp.) and castor cake were composted with Pusa soil under aerobic conditions for 10 weeks at room temperature (28—30° C) in the following ratios of manure to soil.

Ingredient	Guar	Dhaincha	Sunnhemp	Cowpea	Castor cake
	gs.	gs.	gs.	gs.	gs.
Manure (on dry basis) .	80	77	80	126	100
Nitrogen %	2.825	2.875	2.825	1.63	10.6
Soil added	475	440	570	600	100

The green manures were partially dried in the sun to drive away the excess of moisture and then mixed with the soil. Enough of distilled water was added to supply 16% moisture. The mixture was filled loosely in big glass jars and covered loosely with lids. The moisture lost was recouped once a fortnight for 10 weeks. The losses of nitrogen and organic matter were determined at the end of incubation and were shown in table 4.

Table 4. Showing the Percentage Loss of Nitrogen and Organic matter of Organic Nitrogenous manures on Fermentation.

	Guar	Dhaincha	Sunnhemp	Cowpea	Castor cake
	%	%	%	%	%
Loss of Nitrogen . . .	19.6	22.6	34.0	28.7	34.8
Loss of Organic matter	14.0	11	15.0	14	18,0

The loss of nitrogen was maximum with sunnhemp and castor cake and minimum with guar. The loss of organic matter was highest with castor cake and least with dhaincha which shows that the available carbohydrate is very high in the former and poorer in the latter.

The loss of nitrogen must have been mostly due to the volatilisation of ammonia, but not due to denitrification as the conditions were entirely aerobic. The low loss of nitrogen in guar may be due to the efficacy of its porous nature in absorbing the free NH_3 and the high loss in the castor cake may be due to the low C : N ratio.

The air dried composts were tested for their nitrifying and CO_2 producing capacity as usual. The unfermented materials were also tested for comparison and the results were given in table 5.

The data presented in the table 5 show that the unfermented cowpea contained more available carbohydrates than the rest of the materials since the CO_2 production was high. Its per cent of nitrogen present was also less and the per cent of nitrification was, however, as high as guar, although the amount of carbohydrates contained in the material was high. The quality of carbohydrate present and the nature of cell-walls were not detrimental to the per cent of nitrification of the organic nitrogen contained in this material. The per cent of nitrogen in guar, dhaincha and sunnhemp was approximately the same. Their capacity to produce CO_2 indicates that the sunnhemp was poor in available carbohydrates, while their nitrifying capacity shows that sunnhemp and dhaincha contained some factor which depressed their nitrification. It was probably due to the protective action of the cuticularised or sclerenchymatous cell-walls of their stems against the nitrification of the intracellular nitrogen.

Table 5. Showing the effect of Fermentation on Nitrification of CO_2 Production of Organic Manures.

Treatment	Nitrification			CO_2 Production	
	Incubation	Maximum	Difference over control	mgs. per day (Average for 6 days)	Decrease over control
	Weeks	%	%	mgs.	mgs.
Guar unfermented	6	49.5	—	153.3	—
Guar fermented	16	27.2	— 22.3	9.2	— 144.1
Dhaincha unfermented	6	27.2	—	150.5	—
Dhaincha fermented	10	22.3	— 4.9	9.2	— 141.3
Sunnhemp unfermented . . .	6	27.2	—	80.4	—
Sunnhemp fermented	16	33.2	6.1	10.5	— 69.9
Cowpea unfermented	6	49.5	—	176.0	—
Cowpea fermented	10	19.8	— 29.7	7.8	— 168.2
Castor cake unfermented . . .	6	59.6	—	18.6	—
Castor cake fermented	10	44.5	— 15.1	13.0	— 5.6
Cattle manure unfermented .	2	3.3	—	—	—
Cattle manure fermented . . .	6	52.0	48.7	—	—

The C : N ratio of castor cake was narrow, and its nitrifying capacity was high. The production of CO_2 was low. The results indicate the absence of large amounts of available carbohydrates in the material and their least influence in the depression of nitrification. There was no positive correlation between nitrification, CO_2 production and C : N ratio of the material.

The nitrification of the residual nitrogen after a preliminary aerobic fermentation was very low in all cases except cattle manure and sunnhemp showing that quickly available nitrogen was lost during fermentation. The cowpea suffered most. It was, however, increased enormously with cattle manure, partly due to the suppression of denitrifying organisms and partly due to the disintegration of the complex proteins contained in the cattle feaces. Sunnhemp was also improved as a result of the disintegration of the sclerenchymatous cells and complex proteins.

The production of CO_2 was very low with fermented manures as the available carbohydrates must have been fermented and left only difficultly decomposable carbohydrates in the residue. The amount of CO_2 produced is a direct measure of microbial activity and the supply af available carbohydrates. Very little correlation was found to exist between either CO_2 production or the C : N ratio and the nitrification of organic manures. When the C : N ratio is same, a high production of CO_2 indicates, in general, a high nitrifying capacity of the materials, such as guar. Though sunnhemp and dhaincha contain the same C : N ratio as guar, their capacity to produce CO_2 and NO_3 was poorer than that of guar.

The Influence of quick acting manures on the Availability of slow acting ones.

From the practical point of view, it is not possible to supply the nitrogen deficiency of soils in the form of bulky organic nitrogenous manures alone. Hence, a mixture of bulky and concentrated manures have to be used. Moreover, Hutchinson and Richards (loc. cit.) reported that an addition of available nitrogen increased the rate of decomposition of organic matter. Experiments were, therefore, started by supplying 15 mgs. of nitrogen per 100 gs. of soil in the form of castor cake and the remaining 15 mgs. in the form of bulky manures. The results of nitrification and CO_2 production were recorded in table 6.

Table 6. Showing the Nitrification and CO_2 Production of a mixture of Bulky organic manures and Castor cake.

Treatment	Nitrification				CO_2 Production		
	Incubation period	Maximum	Theoretical	Difference	mgs. per day (Av. for 6—9 days)	Theoretical	Difference
	Weeks	%	%	%	mgs.	mgs.	mgs.
Castor cake + Guar:							
unfermented	6	47.0	54.6	— 7.6	88.1	86.0	2.1
fermented	16	33.8	35.9	— 2.1	11.5	11.1	0.4
Castor cake + dhaincha:							
unfermented	6	42.1	43.4	— 1.3	77.8	84.6	— 6.8
fermented	4	22.3	33.4	—11.1	11.1	11.1	Nil
Castor cake + sunnhemp:							
unfermented	6	49.5	43.4	6.1	47.4	49.5	— 2.1
fermented	16	49.5	38.9	10.6	14.4	11.8	2.6
Castor cake + cowpea:							
unfermented	4	44.7	54.6	— 9.9	116.0	97.3	8.7
fermented	10	29.7	32.2	— 2.5	10.9	10.4	0.5
Castor cake + cattlemanure:							
unfermented	2	3.3	31.5	—28.2	20.2	—	—
fermented	4	54.5	48.8	5.7	22.2	—	—

The theoretical value was calculated from the mean values of the nitrification and CO_2 production of the individual manures. There was depression of nitrification in all the mixtures except sunnhemp. It was less with fermented manures except dhaincha. There was an actual increase in the nitrification of fermented cattle manure and sunnhemp. This suggests that the available nitrogen may be one of the limiting factors for the nitrification of organic

manures. The complete suppression of nitrification of castor cake by the fresh cattle manure may be due to predominance of nitrate assimilating bacteria in the latter.

The production of CO_2 was slightly increased in the mixtures of guar, cowpea and fermented sunnhemp with fermented castor cake and was slightly decreased with the unfermented dhaincha and sunnhemp mixtures. The proportion of easily available to difficultly available C or N contained in the manure also determines its nitrification.

Discussion.

The addition of carbohydrates depressed the nitrification of castor cake. This may be explained on the basis that it increased the assimilation of ammonia and nitrates for the synthesis of microbial proteins of the nitrogen assimilating microorganisms developed to an such enormous extent as to antagonise the growth of ammonifying and nitrifying organisms. The deliterious effect was maximum with starch as it can encourage the growth of former class of microorganisms for a longer time than dextrose. When the carbohydrates were fermented in the soil for 10 weeks before the addition of castor cake, the magnitude of depression in the nitrification of castor cake was same irrespective of the nature or carbohydrate used.

Carbohydrates did not always cause the depression of nitrification. They increased the per cent of nitrification of groundnut cake which was poor in available carbohydrates.

The addition of easily available nitrogenous manures like castor cake increased the nitrification of sunnhemp which was probably lacking in available nitrogen required for the decomposition of difficultly decomposable carbohydrates and complex cell-walls.

The per cent of nitrification was increased in cattle manure on aerobic fermentation which may be due to the partial destruction of nitrogen assimilating bacteria and partly due to an increase in the formation of available carbohydrates during the process of fermentation from the complex carbohydrates present originally in the raw material. The per cent of nitrification was also increased with sunnhemp on aerobic fermentation. This may be due to the disintegration of complex carbohydrates into simpler forms which supply the necessary energy to decompose the complex proteins. Including the loss of nitrogen, aerobic fermentation had increased the per cent of nitrogen mineralised from dhaincha and castor cake.

The loss of nitrogen was high on aerobic fermentation of all the organic nitrogenous manures. It was higher in the materials richer in available nitrogen and poorer in available carbohydrates. The residual matter after fermentation was, in most of the cases, poor in the nitrificability and the production of CO_2, showing the lack of available nitrogen and carbohydrates.

The results tend to point out the necessity of keeping the proper balance of the available nitrogen and carbohydrates for maintaining high per cent of nitrification. If the supply of available nitrogen is high, loss of nitrogen is high, loss of nitrogen may occur as a result of volatilization of ammonia. If the available carbohydrates is low, nitrification will be low for lack of energy and if high, the assimilation of ammonia and nitrates by the microorganisms results in a depression of nitrifiability.

The soaking of sunnhemp and dhaincha for 24 hours in 5% K_2CO_3 solution and 5% H_2SO_4 respectively increased the nitrification of the residues. Those treatments undoubtedly break down the complex cell-walls and expose the intracellular proteins and other compounds for bacterial action. This treatment seems to be necessary to disintegrate complex (sclerenchymatous, cuticularised or liquified) cell-walls so that the contents of their cell or other cells lined by them may be thoroughly decomposed. This factor did not receive due consideration by the previous workers.

There was no definite correlation between the nitrification, CO_2 production and C : N ratio of different organic nitrogenous manures except when they have approximately the same C : N ratio. In general, it may be said that when the C : N ratio is same, the production of CO_2 has a positive correlation with the nitrifiability.

Summary.

(1) The nitrification of castor cake was depressed by starch, cellulose and dextrose in their descending order. They, however, increased the nitrification of groundnut.

(2) The production of CO_2 was increased by dextrose, starch and cellulose in their descending order.

(3) Fermentation of the carbohydrates with Pusa soil for 10 weeks before the addition of castor cake, caused an uniform depression of nitrification irrespective of the nature of carbohydrate originally added.

(4) The chemical nature and permeability of the cell-walls seem to control the nitrification of intracellular nitrogen. The treatment of the materials with distilled water, 5% K_2CO_3 or 5% H_2SO_4 resulted in a considerable loss of nitrogen and a poor nitrification of the residual nitrogen of some, which that of others was increased, especially sunnhemp and dhaincha treated with 5% of K_2CO_3 und H_2SO_4 respectively. The latter was due to a better disintegration of their sclerenchymatous and cuticularised cell-walls respectively.

(5) Fermentation of dhaincha, sunnhemp, cattle manure or castor cake under aerobic conditions for 10 weeks resulted in a loss of total nitrogen.

(6) The nitrification of the residual nitrogen and the production of CO_2 was low in all except sunnhemp and cattle manure. If the nitrogen lost during fermentation was to be taken into account, aerobic fermentation with Pusa soil in general rendered a greater proportion of complex nitrogen mineralised.

(7) The nitrification of mixtures of bulky and concentrated organic nitrogenous manures was lower than that of the theoretical value except with fermented sunnhemp and cattle manure mixed with fermented castor cake.

(8) The production of CO_2 was slightly increased from guar, cowpea and fermented sunnhemp when mixed with castor cake.

(9) There was no correlation between the nitrification C : N ratio and CO_2 production of widely divergent materials.

Acknowledgment.

The author wishes to thank C. M. Hutchinson Esquire, C.I.E., the late Imperial Agricultural Bacteriologist of the Imperial Institute of Agricultural Research, Pusa, India, for the facilities given.

Bibliography.

1. Anbel, E. A., Compt. Rend. Acad. Sci. Paris. T. 171. 1920. p. 478—480. — 2. Brown, P. E., Iowa State. Col. Agric. Res. Bull. No. 11. 1912. — 3. Coleman, L. C., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 20. 1908. S. 401—420. — 4. Hutchinson, C. M., and Milligan, S., Agric. Res. Inst. Pusa. Bull. No. 40. 1914. — 5. Hutchinson, H. B., and Richards, E. H., Journ. Min. Agric. Vol. 28. 1922. p. 398—411. — 6. Joshi, N. V., Agric. Journ. India. Vol. 14. 1919. p. 395—413. — 7. Kelley, W. P., Hawaiin. Agric. Exp. Stat. Bull. No. 24. 1914. — 8. Kendell, A. I., and Farmer, C. J., Journ. Biol. Chem. Vol. 12. 1912. p. 13—17. — 9. Kendell, A. I., and Farmer, C. J., Journ. Biol. Chem. Vol. 12. 1912. p. 19—21. — 10. Kendell, A. I., and Farmer, C. J., Journ. Biol. Chem. Vol. 12. 1912. p. 215—218. — 11. Kendell, A. I., and Farmer, C. J., Journ. Biol. Chem. Vol. 12. 1912. p. 465—468. — 12. Leather, J. W., Mem. Dept. Agric. India. Chem. Ser. I. 1911. p. 205—281. — 13. Lipman, I. G., Agric. Exp. Stat. Rept. Soil. Chemist & Bacteriologist. New Jersey 1911. p. 159—267. — 14. Lipman, I. G., Agric. Exp. Stat. Bull. No. 251. New Jersey 1912. — 15. McLean, H. C., and Wilson, C. W., Agric. Exp. Stat. Bull. No. 270. New Jersey 1914. — 16. Raistrick, H., and Clark, A. B., Biochem. Journ. Vol. 15. 1921. p. 76—82. — 17. Richards, E. H., and Norman, A. G., Biochem. Journ. Vol. 25. 1931. p. 1769—1778. — 18. Russell, E. J., and Richards, E. H., Journ. Agric. Sci. Vol. 10. 1920. p. 12—43. — 19. Waksman, S. A., and Tenney, F. G., Soil. Sci. Vol. 22. 1926. p. 395—406. — 20. Waksman, S. A., and Iyer, K. R. N., Soil. Sci. Vol. 34. 1932. p. 43—69. — 21. Wright, R. C., Journ. Anner. Soc. Agron. Vol. 7. 1915. p. 193—208.

Buttersäuregärung und Milchsäuregärung im Silofutter.

[Aus der bakteriologischen Abteilung der Staatlichen landwirtschaftlichen Versuchsstation Hoorn, Niederland.]

Von **J. van Beynum** und **J. W. Pette.**

Einleitung.

In unserem Klima kann das Vieh im Winter nur mit konserviertem Futter gefüttert werden. Meistens ist die Konservierung eine Trocknung, die Heubereitung. Aber seit vielen Jahren wird auch ein Teil des Futters in feuchtem Zustande konserviert in Silos, Gruben oder Feimen, indem es entweder in frischem Zustande oder mehr oder weniger abgewelkt zusammengepreßt und durch Abdeckung mit Lehm oder Ton vor Sauerstoffzutritt geschützt wird. Während der letzten Jahre ist diese Art der Konservierung mehr in den Vordergrund gerückt[1]).

Man kennt jetzt schon mehrere Methoden der Grünfutterkonservierung, z. B.:

1. Sauerfutter, wobei im Futterstock die Temperatur niedrig gehalten wird. Der Name des Franzosen Goffart ist hiermit verbunden.

2. Süßgrünfutter. Es war besonders der Engländer Fry, der empfahl, daß bei der Ensilierung die Temperatur im Futter hoch ansteigen sollte.

3. Kaltvergärung nach der Methode Völtz. Das Futter wird so frisch wie möglich ensiliert unter Zugabe von Zucker.

4. Mineralsäure-Silage nach Virtanen. Die Konservierung wird durch Salzsäure und Schwefelsäure bewirkt.

Es gibt aber noch eine Anzahl Methoden, die zwischen den genannten vier stehen. Das sind z. B. die holländische Methode, die zwischen 1 und 2, und die ostpreußische Methode, die zwischen 3 und 4 steht.

Das Ziel der Ensilierung ist eine Konservierung der wertvollen Bestandteile des Futters, insbesondere der Eiweißstoffe. Allgemein wird angenommen, daß für diese Konservierung Luftabschluß und hoher Säuregrad von ausschlaggebender Bedeutung

---

[1]) Siehe auch Kirsch und Hildebrandt, „Die Silofutterbereitung nach dem Kaltgärverfahren." Berlin, Verlag Parey, 1930.

sind. Wo der Sauerstoff der Luft frei hinzutreten kann, wird das Futter infolge der Tätigkeit der aeroben Mikroorganismen (u. a. Schimmelpilze) zersetzt. Es ist schon lange bekannt, daß ein hoher Säuregrad Bakterienwachstum hemmt oder sogar unmöglich macht. Der Saft aus frischem Gras hat einen p_H von ungefähr 6, und tatsächlich ist der p_H der angeblich gut gelungenen Silagen niedriger als 6. Wir fanden in holländischen Silagen z. B. p_H-Werte von 4,7—5,5. Allerdings ist ein solcher Säuregrad nur wenig konservierend. Von uns untersuchte Völtz - Silagen hatten p_H-Werte von ungefähr 4,2.

Das Ergebnis der Ensilierung hängt von einer Anzahl Faktoren ab, und darum hat Virtanen alle Unsicherheiten vermeiden wollen, indem er den Säuregrad vom Anfang an erhohte durch Zusatz von Salzsäure und Schwefelsäure. Es wird dann sofort der konservierende Säuregrad (p_H unter 4) erreicht.

Kirsch und Hildebrandt erkannten den Nutzen einer Milchsäuregärung. Ihr Verfahren ist ein gemischtes Mineralsäure- und Gärverfahren.

Wenn chemische Stoffe nicht in solcher Konzentration zugefügt werden, daß jede Bakterienentwicklung unmöglich ist, sind die bakteriellen Prozesse in der Silage von großer Wichtigkeit. Man kann hierbei nützliche und schädliche Bakterien unterscheiden. Nützlich sind die Milchsäurebakterien, weil sie den Säuregrad erhöhen; schädlich sind die Fäulnisbakterien, weil sie Eiweißstoffe zersetzen und die Ammoniakproduktion den Säuregrad erniedrigt. Andere Bakterien zeigen sich u. U. erst bei Verabreichung des Futters schädlich. Buttersäurebakterien z. B. können sich im Molkereibetrieb schädigend auswirken, indem sie im Käse unerwünschte Gärungen hervorrufen. Der Einfluß des Silofutters auf die Käsequalität ist schon lange bekannt.

A. Die Mineralsäuremethode.

Das Grünfutter wird schichtweise in den Behälter gebracht und jede dünne Schicht wird mit soviel einer doppeltnormalen Lösung von Salzsäure und Schwefelsäure (A.I.V.-Säure) bespritzt, daß nach dem Absterben der Pflanzen die Futtermasse einen p_H unter 4 aufweist. Unterhalb dieser p_H-Grenze sollen schädigende bakteriologische Prozesse nicht auftreten. Daß die Sache aber nicht so einfach ist, erfuhren wir schon im Winter 1932—33[1]), als nach Verfütterung einer Silage, die mit Salzsäure und Zucker konserviert war, die bereiteten Versuchskäse heftige Buttersäuregärung zeigten, obwohl der p_H der Silage 3,7 war. Bei der bakteriologischen Analyse einer Anzahl solcher Silagen wurden oft große Mengen von Buttersäurebakterien gefunden. Nur die sehr sauren Silagen enthielten nur wenige oder keine Buttersäurebakterien. Es war schwierig, zu erklären, warum so viele Buttersäurebakterien im Futter vorkamen. Virtanen selbst war damals der Meinung, daß die im Mineralsäurefutter nachgewiesenen Bakterien vom frischen Grase stammten, daß sie somit in der Silage konserviert waren. Das erklärt aber nicht die von uns festgestellte Gefahr für die Käsebereitung, denn frisches Gras ist nach unserem Wissen niemals Ursache der Buttersäuregärung im Käse gewesen. Die zweite Möglichkeit, nämlich die einer Entwicklung der Buttersäurebakterien erst im sauren Futter, erschien aber bei diesen niedrigen p_H-Werten ebenfalls nicht wahrscheinlich.

I. Die Konstanz der Wasserstoffzahl in einem „Säure-Gras-Gemisch".

Das chemische Gleichgewicht in einem komplizierten System, wie die Gras-Säure-Silage, stellt sich nicht sofort ein. Die Pflanzensäfte reagieren erst mit der Säure, wenn die Zellen abgestorben sind, und die puffernde Wirkung der Eiweißstoffe vollzieht sich nur allmählich. Es wäre darum

---

[1]) J. van Beynum en J. W. Pette, Bacteriologisch onderzoek van een aantal in 1932 volgens de mineraalzuurmethode gemaakte kuilhoopen. Verslagen van landbk. onderz. der Rijkslandbouwproefstations, No. 39 C. 1933. p. 545.

nicht unmöglich, daß der End-p_H erst nach längerer Zeit erreicht würde, daß der p_H somit fortwährend ansteige und endlich Bakterienwachstum, insbesondere der Milchsäure- und Buttersäurebakterien, einträte, wobei die Milchsäurebildung den p_H wieder unter 4 erniedrigen könnte. Besonders bei den Silagen mit p_H-Werten in der Nähe von 4, z. B. 3,7, wäre diese Hypothese nicht sofort als unwahrscheinlich zu betrachten. Wenn man einen großen Behälter nach dem Säureverfahren füllt, zeigt der abfließende Saft einen p_H-Anstieg. Wir beobachteten z. B. in 4 Tagen einen Anstieg von 2,19 auf 2,92.

Für exaktere Versuche ensilierten wir Gras in zylindrischen Gläsern. 500 oder 600 g Gras wurden zerschnitten und mit einer Lösung von Salzsäure in Wasser angefeuchtet, dann mit einem Bleigewicht von 10 kg zusammengepreßt, das ist ein Druck von ungefähr 125 g pro Quadratzentimeter; damit die Flüssigkeit in den Zylindern nicht mit Blei in Berührung kam, wurde das Gewicht auf einen Paraffinblock gestellt. Wenn nach einiger Zeit der Saft über das Gras stieg, wurde der Druck vermindert und das Grasflüssigkeitsgemisch mittels Paraffinöls von der Luft abgeschlossen, um die Entwicklung aerober Mikroorganismen zu verhindern. Alle Flüssigkeit blieb in den Zylindern; dieser Umstand begünstigt nämlich eine gleichmäßige Zusammensetzung der ganzen Masse und erlaubt mehrere p_H-Messungen im Saft voruznehmen.

Weil Bakterien Wirkungen entfalten können, die Einfluß auf den Säuregrad ausüben, sollte jede Bakterienentwicklung unterdrückt werden. Dies gelang am besten mit Formaldehyd ($5^0/_{00}$, berechnet auf die Menge des frischen Grases).

Die Glaszylinder der Tab. 1 wurden am 26. Juni 1933 mit 500 g Gras beschickt, das mit 50 ccm Formalin- und 50 ccm Salzsäurelösung angefeuchtet worden war. Die Salzsäurekonzentration ist in der Tabelle angegeben mit der Anzahl Kubikzentimeter konzentrierte Säure auf 500 g Gras.

Tabelle 1.

Salzsäure	p_H des Saftes am					p_H in der unteren Grasschicht am 20. Okt.
	27. Juni	29. Juni	15. Juli	23. Sept.	20. Okt.	
0	—	5,41	5,41	5,39	5,24	5,36
2	4,43	4,48	4,51	4,44	4,43	4,39
4	3,33	3,50	3,53	3,49	—	3,47
6	2,26	2,65	2,81	2,77	2,76	2,75

Flüssigkeit und Gras sind während der langen Zeit dieses Versuches steril geblieben. Die elektrometrischen p_H-Messungen wurden vorgenommen im über dem Grase stehenden Saft, der mit einer sterilen Pipette entnommen wurde. Die Bestimmung in der unteren Grasschicht am 20. Okt. beweist, daß eine „homogene Verteilung“ von Säure und Gras vorlag. Der Versuch ergibt, daß das Gleichgewicht schnell zustande kommt und daß nachher keine p_H-Steigerung beobachtet wird. Nur in dem unnatürlich stark sauren Gemisch stieg der p_H ein wenig an, offenbar wegen einer Eiweißhydrolyse.

II. Säuregrad der Silage und Milchsäurebakterien.

Die Entwicklung der Milchsäurebakterienflora ist auch in Glaszylindern studiert worden, weil dieses Ensilierungsverfahren die beste Homogenität der Masse wegen des vielen Saftes garantiert. Die Zylinder wurden aufbewahrt bei Zimmertemperatur (17—22° C). Der Nachweis der Milchsäurebakterien geschah mittels Plattenkultur auf Traubenzucker-Fleischwasser-Pepton-Gelatine (p_H 6).

Geimpft wurde mit sterilisiertem Wasser, worin ein Stückchen des Grases geschüttelt wurde, oder mit dem verdünnten Saft.

Tab. 2: In jedem Glaszylinder wurden am 10. Juli 1933 600 g Gras ensiliert unter Zusatz von jeweils 100 ccm Salzsäurelösung, enthaltend 1, 2, 4 oder 6 ccm konzentrierte Salzsäure.

Tabelle 2.

Salzsäure	Bestimmung im überstehend. Safte am					Bestimmung am 6. Nov.			
	11. Juli	21. Juli		23. Aug.		Saft	Obere Schicht	Untere Schicht	
	p_H	p_H	Milchsäurebakterien	p_H	Milchsäurebakterien	p_H	p_H	p_H	Milchsäurebakterien
1	5,27	3,96	sehr viele	4,10		4,46	4,43	3,98	sehr viele
2	4,50	3,82	sehr viele	3,84	sehr viele	3,84	3,84	3,86	sehr viele
4	3,02	3,60	keine	3,73	sehr viele	3,77	3,73	3,51	sehr viele
6	2,40	2,71	keine	3,10	keine	2,99	2,98	2,98	keine

Dieser und mehrere gleiche Versuche ergaben folgendes:

1. Wird soviel Säure zugesetzt, daß der Anfangs-p_H über ungefähr 3,5 liegt, so tritt nach längerer oder kürzerer Zeit Milchsäuregärung auf. Die anfänglich heterogene Bakterienflora wird alsbald unterdrückt durch die Milchsäurebakterien.

2. Weil die Einwirkung des Sauerstoffs nie ganz auszuschließen ist, steigt der p_H durch die Wirkung von Hefen, einzelnen Schimmelpilzen und aeroben Bakterien sehr langsam an, besonders in den oberen Schichten.

3. Ist die Menge der Mineralsäure unzureichend, um den p_H unter 3,5 zu erniedrigen, so wird der Endsäuregrad bestimmt durch die Wirkung der Milchsäurebakterien.

Selbstverständlich gelten diese Folgerungen nur für die Versuchsbedingungen, wie sie bei unseren Versuchen waren.

Die erste und die dritte Folgerung sind die wichtigsten. Aus der ersten Folgerung schließen wir, daß das von Virtanen empfohlene p_H-Gebiet in zwei Teile zerfällt: 1. in einen Teil 3—3,5, wo keine Milchsäuregärung auftritt, und einen Teil 3,5—4, wo jedenfalls Milchsäuregärung stattfindet. Weiter unten werden wir sehen, daß diese Verteilung des p_H-Gebietes 3—4 wichtige Konsequenzen nach sich zieht.

Die dritte Folgerung sagt aus, daß, wenn die Menge der zugesetzten Säure zu gering ist, um an und für sich den End-p_H unter 4 zu senken und folglich der p_H nach einiger Zeit wegen der fortschreitenden Pufferung über 4 steigen würde, die eintretende Milchsäuregärung diesen letzten Anstieg verhindert.

III. Säuregrad der Silage und Buttersäurebakterien.

Der Säuregrad eines Nährbodens ist von großer Bedeutung für die Entwicklungsmöglichkeit der im Boden vorkommenden Bakterien. Selbstverständlich ist bei sehr hohem Säuregrad jedes Bakterienwachstum unmöglich. Man kann auch bei der Ensilierung des Grases so viel Säure zusetzen, daß Bakterienentwicklung unterbleibt oder daß sogar die Bakterien samt ihren Sporen absterben.

Es ist hier aber die Frage, ob Buttersäurebakterien sich noch entwickeln im p_H-Gebiet 3—4. Von 214 Stämmen von Buttersäurebakterien wurde die Säureresistenz untersucht in Traubenzucker-Fleischwasser-Pepton mit Salzsäure. Gezüchtet wurde bei 28° C in Röhrchen, welche nach der Impfung evakuiert und zugeschmolzen wurden. Die Säureresistenz der verschiedenen Stämme weist große Unterschiede auf. Im allgemeinen ist für alle Stämme ein Säuregrad von p_H über 5 nicht schädlich, aber unterhalb 5 wird die Säurewirkung merkbar. Bei p_H 4,77 z. B. zeigten schon 28% der Stämme kein Wachstum mehr. 51% entwickelte sich nicht bei p_H 4,4, 70% nicht bei p_H 4,24. Von den Kulturen, welche bei p_H 4,24 angingen, setzte das Wachstum bei 75% erst nach 3 Monaten ein. Es ist einleuchtend, daß bei einem p_H unterhalb 4 kein Wachstum mehr möglich ist.

Auch unter praktischeren Verhältnissen haben wir den Einfluß des Säuregrades studiert, nämlich in Grassilagen in Glaszylindern. Die Gleichmäßigkeit wurde wiederum hergestellt durch Gebrauch von viel Wasser.

Die Buttersäurebakterien in der Silage wurden nachgewiesen, indem ein wenig ensiliertes Gras, mit sterilen Pinzetten der Masse entnommen, in einem sterilisierten Mörser (bisweilen unter Zusatz von Kreide, um Säure zu neutralisieren) zerquetscht wurde und die zerquetschten Halme in Traubenzucker-Pepton-Fleischwasser geimpft wurden. Nur wenn Fäulnisbakterien in größerer Anzahl in der Silage vorkamen (Fäulnisgeruch!), wurde auch in Milch mit 1% Traubenzucker und 2,5 ccm n/1 Milchsäure pro 100 ccm geimpft.

Mit Absicht haben wir nur Traubenzuckernährböden verwendet, um den beiden Arten der Buttersäurebakterien, Cl. saccharobutyricum und Cl. tyrobutyricum, die Entwicklung zu gestatten[1]). Beide Arten kommen in Silagen vor. Die dritte Art der verflüssigenden Buttersäurebakterien ist nur selten nachzuweisen.

Nach der Impfung wurden die Röhrchen evakuiert und pasteurisiert. Auf gleiche Weise wurden auch Kulturen angefertigt in Traubenzucker-Pepton-Fleischwassergelatine. Diese Kulturen gestatten aber keine Bestimmung der Anzahl von Buttersäurebakterien, weil nur ein geringer Prozentsatz der eingeimpften Buttersäurebakteriensporen zu Kolonien auswächst und dieser Prozentsatz für jeden Stamm verschieden ist.

In jedem Silagemuster wurde auch eine Bestimmung der flüchtigen Säuren ausgeführt. Das Vorkommen der Buttersäure ist nämlich ein wichtigeres Merkmal einer stattgefundenen Buttersäuregärung als der Nachweis der Buttersäurebakterien, denn die nachgewiesenen Buttersäurebakterien können in der Silage vom Anfang ab als Sporen erhalten sein.

100 g Silage wurden mit destilliertem Wasser 24 Std. lang digeriert. 150 g Wasser wurde gebraucht, wenn die Silage wenig Buttersäure enthielt, sonst 900 g Wasser. Vom Filtrat wurden 100 ccm destilliert nach einer abgeänderten Duclaux-Methode.

---

[1]) J. van Beynum und J. W. Pette, Zuckervergärende und Laktatvergärende Buttersäurebakterien. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 93. 1935. S. 198.)

Nach Abdestillierung von jedesmal 30 ccm wurde mit heißem destillierten Wasser das ursprüngliche Volumen von 110 ccm wiederhergestellt[1]).

Milchsäure wurde bestimmt durch Titrieren des ätherischen Extraktes nach Abzug der flüchtigen Säuren.

Aus den von uns ausgeführten Versuchsreihen bringen wir in Tab. 3 eine. Die Glaszylinder waren am 22. August 1933 gefüllt mit 550 g Gras und 100 ccm Salzsäurelösung. Die Analyse wurde nach 118 Tagen vorgenommen. Die Zahlen beziehen sich auf die unteren Schichten der Silagen.

Tabelle 3.

Salzsäure ccm	p_H	Buttersäurebakterien	Buttersäure %	Essigsäure %	Milchsäurebakterien	Milchsäure %
1	4,28	ziemlich viele	0	0,58	sehr viele	1,07
2	3,90	ziemlich viele	0	0,40	sehr viele	1,06
3	3,79	viele	0	0,39	sehr viele	0,92
4	3,73	sehr viele	0	0,28	sehr viele	0,77
5	3,64	ziemlich viele	0	0,19	sehr viele	0,61
6	3,21	einzelne	0	0,04	keine	0,29

Essigsäure und Milchsäure sind Produkte der Milchsäuregärung. Die Menge dieser Stoffe nimmt bei steigendem Säuregrad ab. Buttersäure war nicht nachweisbar, obwohl viele Buttersäurebakterien gefunden wurden. Das waren also die „konservierten" Sporen.

Dieser Versuch und viele andere führten zu den nachstehenden Schlußfolgerungen:

1. Bei p_H-Werten von ungefähr 4 und darunter entwickeln sich keine Buttersäurebakterien.
2. Bei p_H-Werten unterhalb 4 können die Buttersäurebakteriensporen entwicklungsfähig bleiben.
3. Bei p_H-Werten unterhalb 3,5 sterben die Sporen, und zwar je niedriger der p_H ist, desto schneller ab. Bei p_H-Werten unterhalb 3 sterben sie schnell.
4. Bei der Buttersäurebakterienanalyse einer Silage weist man sowohl „konservierte" Sporen als die in der Silage entwickelten Bakterien nach.

IV. Die geschichtete Struktur einer Mineralsäuresilage.

Aus dem vorhergehenden scheint zu folgen, daß in einer Silage mit p_H unterhalb 4 auf keinen Fall Buttersäuregärung stattfinden kann. Die Analysen der Silagen aus größeren Silos nach der Mineralsäuremethode (Silagen der landwirtschaftlichen Praxis) ergaben fast immer mehr oder weniger Buttersäure, was somit ein Beweis der stattgefundenen Buttersäuregärung ist.

Wir haben nun die folgenden einander widersprechenden Tatsachen:

1. Buttersäuregärung ist unmöglich bei p_H-Werten unterhalb 4,2 bis 4,0.
2. Silagen mit p_H unterhalb 4 enthalten fast immer Buttersäure.

[1]) J. van Beynum, De Bepaling van vluchtige vetzuren volgens de destillatie-methode. Jaarverslag Proefzuivelboerderij te Hoorn over 1932. Verslagen van landbouwk. onderzoekingen der Rijkslandbouwproefstations. No. 39 C. 1933. p. 57.

3. Die aus Mineralsäuresilagen isolierten Buttersäurebakterien sind nach unserer Erfahrung nicht säurebeständiger als Buttersäurebakterien anderer Herkunft.

Diese Widersprüche können nur miteinander in Einklang gebracht werden, wenn wir annehmen, daß die Futtermasse im Silo Ungleichmäßigkeiten aufweist, wodurch an bestimmten Stellen ein Wachstum der Buttersäurebakterien möglich ist. Nun trifft man fast in jeder Silage Stellen an mit höherem p_H, denn jede kleine Sorglosigkeit bei der Bereitung gibt sich kund durch einen abweichenden p_H. Wir wollen hier aber die Aufmerksamkeit lenken auf Ungleichmäßigkeiten der Silage, welche die Folge der Ausführungsvorschriften der Mineralsäuremethode sind.

Beim Füllen des Behälters wird das Gras in Schichten mit der Säure bespritzt. Es wird also nur bei jeder Schicht die Oberfläche mit Säure benetzt. Das Gras unter dieser Oberfläche kommt erst mit Säure in Berührung wenn die Masse zusammengepreßt ist und ausgetretener Saft die Diffusion der Säure ermöglicht. Auch dann noch ist die Vermischung mit Säure ein langsamer Prozeß, denn Strömungen der Flüssigkeit werden von dichtem Gewebe der Stengel verhindert. Daß eine gleichmäßige Benetzung von Gras mit Säure nie erreicht wird, wenn nicht von vornherein Gras und Säure innig gemischt werden, erfuhren wir mit Silagen der Praxis, wo bei einem Alter der Silage von mehreren Monaten auf kleinen Strecken noch große Unterschiede im p_H-Wert festzustellen waren. So fanden wir in einem Silagemuster auf einer vertikalen Strecke von 7 cm p_H-Werte von 3,07 und 3,93.

Diese große Differenz ist durch zu geringe Sorgfalt bei der Bereitung verursacht, aber sie zeigt doch deutlich die langsame Diffusion. Aber auch bei sorgfältig gefüllten Silos treten diese Ungleichmäßigkeiten auf und sei es nur auf kürzeren Abständen.

Der mittlere p_H-Wert sagt also nichts aus über die Bakterienentwicklung, weil jede Probe zusammengesetzt ist aus Schichten mit höherem und niedrigerem Säuregrad.

In den Schichten, welche sofort mit der Säure in Berührung kamen, war keine Bakterienentwicklung festzustellen, in den Zwischenschichten, die nicht sofort mit Säure benetzt wurden, kann ein Bakterienwachstum während kürzerer oder längerer Zeit auftreten. Darum finden wir Buttersäuregärung in Silagen der Praxis mit „mittlerem“ p_H unterhalb 4 und Milchsäuregärung in solchen Silagen mit „mittlerem“ p_H unterhalb 3,5.

Das Bestehen von Schichten, welche abwechselnd sauer und nichtsauer sind, konnten wir folgendermaßen beweisen:

1. Als wir im Monat Oktober 1933 einen Betonbehälter mit 3400 kg Gras füllten, in dem Portionen von 30 kg auf einer Oberfläche von 3,13 qm ausgebreitet und dann mit 2 l verdünnter A.I.V.-Säure (Salzsäure und Schwefelsäure) bespritzt wurden, stellten wir nach der Mittagspause fest, daß in senkrechter Richtung im Silo Schichten von hoher und niedriger Temperatur vorkamen. Die kalten Schichten waren wegen der Säureeinwirkung von brauner Farbe, die warmen Schichten waren noch grün.

2. Wenn in einer Silage (auch in einer älteren) eine senkrechte Schnittfläche mit einem scharf geschliffenen Spaten hergestellt wird, so erkennt man noch deutlich die Schichtenstruktur. In Silos von einem

Alter von mehreren Monaten ist diese Struktur weniger deutlich und nur noch zu erkennen in den oberen Schichten und der Randzone.

3. Bakteriologische Analysen bestätigen das Bestehen von bakterienfreien und bakterienreichen Teilen. In äußerst dünnen Scheibchen wurden gefunden:

Tabelle 4.

Scheibchen Nr.	Tiefe unter der Oberfläche der Silage	Mittlerer p_H	Milchsäurebakterien
4	13 cm	3,20	keine
6	24 cm	3,00	sehr viele
8	32 cm	3,08	wenige
11	53 cm	2,99	keine
14	67 cm	3,05	keine
15	76 cm	3,18	sehr viele
17	91 cm	3,24	wenige

In einem anderen Silo wurden in einer Schicht mit p_H 2,79 Scheibchen gefunden sowohl mit als auch ohne Milchsäurebakterien.

Auch die Buttersäurebakterienanalyse läßt die Schichtenstruktur deutlich erkennen.

Tabelle 5.

Scheibchen aus einer Schicht von mittlerem p_H	Buttersäurebakterien
2,71	viele
2,61	viele
2,74	keine
3,13	sehr viele

V. Welche Faktoren bestimmen die Gärung in der Mineralsäuresilage?

Das Bakterienwachstum ist also beschränkt auf diejenigen Schichten des Futters, welche nicht sofort mit der Säure benetzt wurden. Die Buttersäuregärung hört auf, wenn der p_H in einer solchen Schicht unter 4,2—4,0 gefallen ist, die Milchsäuregärung, wenn der p_H unter 3,5 sinkt. Je länger diese nicht-sauren Schichten bestehen bleiben, desto stärker ist die Gärung.

Die Dauer des Bestehens dieser Schichten wird bestimmt von folgenden Faktoren:

1. Der Dicke der bespritzten Futterschichten.
   Je dicker die Schichten sind, desto länger dauert die Diffusion der Säure.
2. Dem Wassergehalt des Futters..
   Je wasserärmer das Futter, desto stärker saugen die Oberflächen die Säure auf und desto schwieriger ist die Diffusion. Nicht nur der Wassergehalt der Pflanzenzellen ist hierfür maßgebend, sondern auch das an den Halmen haftende Wasser (Regen, Tau).
3. Der Art des Futters.
   Junges Gras läßt sich besser zusammenpressen als altes sperriges Gras. Im letzteren geht die Diffusion langsamer vor sich.

4. Der Pressung beim Füllen.
   Je stärker man preßt, desto bessere Berührung der Halme wird erreicht.
5. Der Stelle im Silo.
   Die Schichten oben im Silo werden nicht so kräftig gepreßt als die unteren Schichten. Wegen der Reibung der Silowände kann man den Randteil auch nicht so stark zusammenpressen. Hier bleiben also die nicht-sauren Schichten am längsten bestehen.
6. Dem mittleren Säuregrad der Silage.
   Die Säurekonzentration ist ein wichtiger Faktor beim Sacken des ensilierten Futters. Je mehr Säure man verwendet, desto schneller legt sich das Futter zusammen und desto schneller wird eine homogene Mischung von Säure und Futter erreicht.

   Man kann sich durch Versuche im kleinen leicht überzeugen, daß bei höherer Säurekonzentration eine schnellere Saftbildung stattfindet. Dieser Einfluß der Säurekonzentration auf das kürzere oder längere Bestehen der nicht-sauren Zwischenschichten macht sich bemerkbar durch die Menge der Gärungsprodukte. Vom Futter aus einem Betonsilo analysierten wir vier, 25 cm dicke Schichten. Die Differenzen der p_H-Werte wurden verursacht von kleinen Unregelmäßigkeiten der Säuredosierung. Sonst war mit großer Sorgfalt bei der Füllung des Silos (mit 2 m Durchmesser) jedesmal 30 kg Gras abgewogen und über die ganze Oberfläche verteilt worden. Im ganzen Silo waren also die Schichtdicken dieselben.

Tabelle 6.

Mittlerer p_H	Milchsäure %	Buttersäure %	Essigsäure %
3,11	0,22	0,015	0,12
2,79	—	0,012	0,09
2,56	—	Spuren	0,09
3,13	0,38	0,022	0,12

In dieser Tabelle sieht man deutlich eine Beziehung zwischen Säuregrad und Gärung. Man bekommt den Eindruck als wäre noch bei p_H unterhalb 3 Gärung möglich. Wir verstehen aber nun besser, daß sich hier eigentlich die Abhängigkeit des Bestehens der Zwischenschichten von der Säurekonzentration kund gibt.

Das Bakterienwachstum in der mineralsauren Silage ist also abhängig von obengenannten Faktoren. Sie gelten für sorgfältig ensiliertes Futter. Bakterienentwicklung ist überdies auch noch stärker, wenn der Behälter ungleichmäßig gefüllt wird. Ungleichmäßige Arbeit verrät sich durch Stellen mit starkem Buttersäure- oder sogar Fäulnisgeruch.

VI. Die Qualität der Silomilchkäse.

Wir haben eine große Anzahl Silagen aus der landwirtschaftlichen Praxis bakteriologisch und chemisch untersucht und fast in allen Proben Buttersäure und Buttersäurebakterien gefunden, sogar bei sehr hohen Säuregraden. Mit 6 Silagen haben wir Käsereiversuche angestellt (im Parallelversuch wurde

festgestellt, daß Käse aus Milch von mit Heu gefütterten Kühen keine Buttersäuregärung zeigte).

Tabelle 7.

Grassilage bereitet mit	Mittlerer p_H	Käsequalität
A. I. V.-Säure	3,3	gut
A. I. V.-Säure	3,2	gut
Salzsäure und Zucker	3,5	etwas nachträgliche Blähung
A. I. V.-Säure	3,4	gut
A. I. V.-Säure	3,3	gut
Salzsäure und Zucker	3,7	starke nachträgliche Blähung

Im allgemeinen scheint somit eine Silage mit einem p_H unterhalb 3,5 ungefährlich für die Käserei zu sein und eine Silage mit einem p_H über 3,5 jedenfalls verdächtig. Wir können jetzt fragen, wie diese praktische Erfahrung in Einklang zu bringen ist mit theoretisch-bakteriologischen Betrachtungen. Wir wissen, daß die Buttersäuregärung in der Silage im allgemeinen mit sinkendem p_H abnimmt, aber die bakteriologische Analyse ergab keine Beziehung zwischen Käsereigefährlichkeit und Buttersäurebakterienzahl. Z. B. enthielt die 4. Silage der Tabelle 7 sehr viele Buttersäurebakterien und die 6. nur wenige. Die nähere Identifizierung der in den Silagen gefundenen Buttersäurebakterien hat uns die Erklärung dieses Rätsels gegeben. Es gibt nämlich zwei Arten in der Gruppe der nicht-verflüssigenden Buttersäurebakterien, Cl. saccharobutyricum und Cl. tyrobutyricum, bzw. zuckervergärende und laktatvergärende Buttersäurebakterien[1]). Weil nur die Bakterien der letzten Gruppe für Käse gefährlich sind, kann man nur eine Silage als verdächtig betrachten, wenn laktatvergärende Buttersäurebakterien sich in der Silage entwickelt haben. Es ist möglich, aus theoretischen Erwägungen heraus anzugeben, unter welchen Umständen diese Bakterien sich entwickeln. Je schneller und vollständiger eine Milchsäuregärung die Zucker in Milchsäure verwandelt, desto schlechter ist die Entwicklungsmöglichkeit des Cl. saccharobutyricum und desto besser die des Cl. tyrobutyricum. Es ist aber die p_H-Grenze 3,5, welche ungefähr das Wachstum der Milchsäurebakterien bestimmt. Wir wissen, daß bei p_H oberhalb 3,5 eine beträchtliche Milchsäuregärung stattfinden kann. Bei p_H-Werten unterhalb 3,5 ist nur eine schwache Milchsäuregärung in den von Anfang an nichtsauren Zwischenschichten möglich.

Auf die Beziehung zwischen p_H und Absterben der Buttersäurebakterien muß auch hingewiesen werden. Wir sahen ja in Abschnitt III, daß die Bakterien bei p_H unterhalb 3,5 allmählich absterben.

Die zuckervergärende Art Cl. saccharobutyricum wird sich nie in großen Massen entwickeln können, weil ihr Wachstum bald verhindert wird durch die Säurediffusion oder durch die Milchsäuregärung, bei der die Kohlenhydrate angegriffen werden.

Ein dritter Faktor ist der Sauerstoff. Bei der Füllung wird Luft in der Futtermasse mit eingeschlossen. Die Milchsäuregärung ist unabhängig vom Sauerstoff, die Buttersäuregärung nicht. Wo die Pressung am geringsten ist, ist länger Sauerstoff zur Verfügung und kann die Buttersäuregärung

[1]) J. van Beynum und J. W. Pette, Zuckervergärende und Laktatvergärende Buttersäurebakterien. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 93. 1935. S. 198.)

nicht sofort beginnen. Das ist somit in den oberen Schichten des Silos und längs der Wände der Fall. Hier fängt die Milchsäuregärung an und erst später folgt die Buttersäuregärung (Laktatvergärung). In den tieferen Schichten und in der Mitte des Behälters, wo infolge der stärkeren Pressung die Luft schnell ausgetrieben wird, können Milchsäuregärung und Buttersäuregärung zu gleicher Zeit einsetzen. Hier ist also Cl. saccharobutyricum eher zu erwarten.

Die Analysenergebnisse der Silageproben aus der landwirtschaftlichen Praxis stehen im Einklang mit diesen Betrachtungen (siehe weiter unten).

B. Buttersäurebakterien in der holländischen Silage.

Analysen haben ergeben, daß praktisch jede holländische Silage Buttersäuregärung aufweist. Es ist aber auch bekannt, daß nicht jede holländische Silage für die Käsebereitung gefährlich ist. Der Unterschied der zwei Gruppen von Buttersäurebakterien gibt auch hier die Lösung.

Die holländische Silage wird auf sehr verschiedene Weise bereitet. Teilweise angewelktes Gras wird allmählich angehäuft. Je stärker das Gras getrocknet ist und je langsamer die Anhäufung stattfindet, desto höher steigt die Temperatur. Nachdem alles Gras auf den Haufen gebracht ist, wird mit Erde (Ton) abgedeckt. Wenn sehr hohe Temperaturen entstehen (z. B. über 60° C), werden alle sporenlosen Bakterien, also auch die Milchsäurebakterien abgetötet (die hohe Temperatur bleibt sehr lange erhalten).

Eine solche Silage gerät also nicht in Milchsäuregärung und die Buttersäuregärung wird verursacht von Cl. saccharobutyricum. Bleibt die Temperatur niedrig, so ist Milchsäuregärung möglich und die Buttersäuregärung ist eine Tyrobutyricumgärung. In der Praxis ist die Sachlage oft weniger einfach, weil der Temperaturanstieg in der Silage nicht an allen Stellen gleich hoch war.

Findet man nun wirklich diese zwei Silagetypen in der Praxis? Wir haben einige Analysen gemacht von herausgeschnittenen würfelförmigen Silageproben.

Tabelle 8.

	Milchsäure %	Essigsäure %	Buttersäure %	Milchsäurebakterien	PH
Sehr junge holländ. Silage	0,41	0,19	0,22	keine	4,73
¾ Jahr alte Silage . . .	0,76	0,13	1,06	keine	5,03
Dieselbe, tiefere Schicht .	2,30	0,39	0,82	viele	4,53
Bohnen-Mais-Silage . . .	0,54	0,75	0,67	sehr viele	4,3
Grassilage Nr. 15	0,14	0,34	1,10	sehr viele	5,72

Nur mit Hilfe der chemischen Analyse würde man z. B. die „Grassilage Nr. 15“ als eine Silage ohne Milchsäuregärung und die tieferen Schichten der ¾ Jahre alten Silage als Milchsäuresilage bezeichnen. Die anderen Proben sind nicht leicht zu deuten. Die bakteriologische Analyse verrät aber sofort, welche Silageproben Milchsäuregärung hatten und welche nicht. Die Grassilage Nr. 15 hat also doch Milchsäuregärung gehabt. Die Ursache, weshalb die chemische Analyse uns irreführt, ist die Laktatvergärung, bei der bekanntlich Milchsäure in Buttersäure verwandelt wird. Wir sind mehreren Beispielen begegnet, wo der Milchsäuregehalt so niedrig war, daß

man ohne die bakteriologische Analyse genötigt war, die Silage als eine Silage ohne Milchsäuregärung zu betrachten.

Die theoretischen Auseinandersetzungen führten zu der Erkennung, daß es besonders die Milchsäuregärung ist, die die Gefahr der Silage für die Käserei bestimmt. Ohne Milchsäuregärung keine Entwicklung der Buttersäurebakterien vom Typus Cl. tyrobutyricum. Die Milchsäuregärung beim Feimenverfahren ist die erste Bedingung für eine richtige Konservierung. Wir erkennen jetzt aber daneben, daß die Milchsäuregärung die gefährliche Tyrobutyricumgärung auslösen kann, besonders in holländischen Silagen, wo, auch wenn Milchsäuregärung stattgefunden hat, der Säuregrad niemals hoch genug ist, um Buttersäuregärung zu verhindern. Die einsetzende Laktatvergärung erhöht den p_H und so kann die Silage stärker verderben, weil auch bei höherem p_H Fäulnisbakterien eine größere Tätigkeit zu entfalten vermögen.

C. Wie weist man die Tyrobutyricumgärung nach?

Wir kamen somit zu der Auffassung, daß Buttersäuregärung verbunden mit Milchsäuregärung eine Tyrobutyricumgärung sein muß. Alle Faktoren, welche die Milchsäuregärung begünstigen, sind also fördernd für die Entwicklung des Cl. tyrobutyricum. Beim holländischen Feimenverfahren ist die Milchsäuregärung besser möglich, wenn die Temperatur niedrig gehalten wird, was zu erreichen ist, indem man entweder Gras mit hohem Wassergehalt ensiliert oder den Feimen schnell aufbaut und abdeckt.

Bei anderen Ensilierungsmethoden wird die Gefahr der Laktatvergärung größer durch alle Faktoren, die einen hohen Gehalt an Laktaten verursachen. So kann z. B. die Beschickung der Futtermasse mit Zucker gefährlich werden (wenn der End-p_H die Buttersäuregärung nicht hemmt). Beim Mineralsäureverfahren kann somit auch die Zuckergabe die Laktatvergärung verstärken, weil aus dem Zucker mehr Laktat entsteht. Man bedenke auch, daß die Mineralsäuresilagen immer so kalt bleiben, daß Milchsäuregärung stattfindet, sofern der p_H dies gestattet.

Am besten kann man nachweisen ob Tyrobutyricumgärung stattgefunden hat, indem man die erhaltenen Traubenzucker-Pepton-Fleischwasser-Rohkulturen untersucht, wie wir es in unserer Abhandlung über „Zuckervergärende und Laktatvergärende Buttersäurebakterien“ (l. c.) beschrieben haben, also durch Differenzierung mit Mannitpepton und Natriumlaktat-Hefeautolysat. Direkte Impfung der Silage in Mannitpepton und Laktat-Hefeautolysat führt nicht zum Ziel, weil besonders im letztgenannten Boden die Buttersäurebakterien schmierig angehen und die Fäulnisbakterien meistens die Oberhand gewinnen. Jedenfalls muß auch festgestellt werden, daß in der Silage Buttersäuregärung stattgefunden hat (Buttersäurebestimmung).

Schneller, aber nicht ganz einwandfrei verfährt man, indem bestimmt wird, ob Milchsäurebakterien anwesend sind und Buttersäure entstanden ist, denn das gleichzeitige Vorkommen von Milchsäurebakterien und Buttersäure macht eine Silage jedenfalls verdächtig. Beurteilung auf Grund der chemischen Analyse allein können wir nicht empfehlen, weil erstens die Milchsäurebestimmung nicht sehr exakt ist und zweitens ein kleiner Gehalt an Milchsäure nicht aussagt, daß Milchsäuregärung nicht stattgefunden

hat. Wohl aber ist eine Silage verdächtig, wenn bei einem hohen Gehalt an Gesamtsäure die Mengen an Buttersäure und Milchsäure von derselben Größenordnung sind.

D. Analysen von Silagemustern aus der Praxis.

Die in den vorigen Abschnitten entwickelten Theorien haben wir bestätigen können durch Analysen von vielen Mineralsäuresilagen aus der landwirtschaftlichen Praxis (Tabelle 9). Wir bestimmten:

1. Geruch. Buttersäuregeruch verrät die Buttersäuregärung, Essigsäuregeruch deutet auf eine Milchsäuregärung.
2. p_H. Dieses wurde bestimmt in mehreren Schichten der Probe, um einen Eindruck zu gewinnen über die Gleichmäßigkeit der Silage. Der p_H wurde im ausgepreßten Saft auf elektrometrischem Wege gemessen.
3. Milchsäure-, Buttersäure- und Essigsäuregehalt.
4. Das Vorkommen von Buttersäurebakterien (siehe Abschnitt A III) und die Spezies.
5. Das Vorkommen von Milchsäurebakterien mittels Plattenkultur auf Traubenzucker-Fleischwasser-Pepton-Gelatine.
6. Andere Mikroben (Hefen, Fäulnisbakterien).

Für diese Bestimmungen hatten wir mit einem Spaten ausgestochene würfelförmige Silageproben zur Verfügung (20 × 20 × 15 cm). Die Analysenergebnisse dieser Proben kann man nicht übertragen auf den ganzen Siloinhalt, denn oft sind große Unterschiede an verschiedenen Stellen aufzufinden.

Wie zu erwarten war, findet man die höchsten Buttersäurezahlen in den Silagen mit hohem p_H. Bei den Silagen mit p_H oberhalb 4 schwankt der Buttersäuregehalt zwischen 0,13—1,48% (meist 0,4—0,9%), bei p_H 3,5—4 zwischen 0—0,51% (meist 0,1—0,4%), bei p_H 3,0—3,5 zwischen 0—0,40% (meist 0,04—0,22%) und bei p_H unterhalb 3 zwischen 0—0,1% (meist 0,01 —0,05%).

Der Einfluß der Füllungsweise gibt sich kund in den Silagen 3, 35, 78 und 98. Diese stammen aus demselben Betrieb und die p_H-Unterschiede in derselben Probe beweisen, daß gleichmäßige Silagen entstanden sind. Doch sind (mit Ausnahme der Silage 3) die Buttersäurezahlen dieser Silagen höher als in den Silagen anderer Betriebe.

Dies ist auch der Fall bei den Proben 32, 61 und 91 eines anderen Betriebes. Dagegen sind die Buttersäurezahlen der Proben 50, 67, 84 und 107, aus einem Betrieb stammend, besonders niedrig. Man kann das nur erklären, indem man annimmt, daß auf den erstgenannten Betrieben dickere Schichten bespritzt wurden und auf dem letztgenannten sehr dünne.

Im allgemeinen sieht man auch, daß sehr ungleichmäßige Silagen einen höheren Gehalt an Gärungsprodukten aufweisen (Nr. 7, 14).

Die Zahlen über den Gehalt an Milchsäure geben ein weniger deutliches Bild des Zustandes. Erstens sind diese Zahlen nicht sehr exakt, weil auch andere Säuren in den ätherischen Extrakt übergehen. Zweitens sagt der Milchsäuregehalt zur Zeit der Probeentnahme nichts aus über die Intensität der Milchsäuregärung, weil bei der Laktatvergärung Milchsäure zersetzt wird. Darum findet man die niedrigsten Milchsäurezahlen in denjenigen Silagen, welche keine Milchsäuregärung hatten und in den Silagen welche gerade eine kräftige Milchsäuregärung hatten, also in den Silagen mit sehr niedrigem und mit sehr hohem p_H. Die höchsten Milchsäurezahlen trifft man bei einem p_H von etwa 3,5, wo die Milchsäuregärung nicht so stark vom p_H gehemmt wird als die Buttersäuregärung.

Tabelle 9.

Nummer	Gebrauchte Säure	Rohrzucker %	Geruch der Silage	p_H im Mittel	p_H variierend von
1	Salzsäure	—	Buttersäure	4,12	—
2	Defu	0,2	Buttersäure, etwas Fäulnis	4,18	—
3	A. I. V.	—	Früchten	3,00	—
5	Defu	0,2	Buttersäure, etwas Fäulnis	4,62	—
{ 6	A. I. V.	—	Buttersäure	4,32	3,84—4,97
{ 49	A. I. V.[1])	—	Buttersäure, Fäulnis	5,20	5,11—5,31
{ 7a	} A. I. V.[2])	—	Süß, Ester	2,68	—
{ 7b	} A. I. V.[2])	—	Essigsäure	3,26	—
{ 7c	} A. I. V.[2])		Buttersäure	4,04	—
11	Defu	0,2	Süß	3,40	3,37—3,43
12	Defu	0,25	Buttersäure	4,07	3,82—4,63
13	Defu	0,2	Buttersäure	3,75	3,61—3,90
14	?	?	Essigsäure	3,08	2,72—3,93
16	A. I. V.	—	Essig, acetamid	2,89	2,89—3,41
{ 18	A. I. V.	—	Buttersäure	4,86	4,82—4,89
{ 27	A. I. V.[1])	—	Frisch	2,15	2,08—2,18
22	A. I. V.[3])	—	Rüben	3,60	3,58—3,65
25	Defu	0,2	Buttersäure	4,11	3,88—4,13
26	Defu	0,2	Ester	3,82	3,66—4,10
32	Defu	—	Etwas Buttersäure	3,30	3,24—3,32
33	HCl	—	Buttersäure, Ester	4,50	4,42—4,54
34	Defu	0,2	Süß, Ester	3,49	3,41—3,49
35	A. I. V.	—	Buttersäure, Ester	3,45	3,26—3,66
37	A. I. V.	—	Süß, etwas Essig	3,10	3,10—3,18
38	A. I. V.	—	Buttersäure	4,01	3,63—4,14
43	Defu	0,2	Etwas Buttersäure	4,43	4,23—4,73
44	Defu	0,2	—	3,57	3,55—3,67
45	A. I. V.	—	Süß	3,33	3,26—3,44
46	Defu	0,2	Süß	3,37	3,34—3,39
47	Salzsäure	—	Frisch, etwas Essig	3,86	3,85—3,86
50	Defu	0,2	Süß, etwas Essig	3,70	3,64—3,73
53	Penthestha[3])	—	Rüben	3,75	3,72—3,81
55	Defu	0,2	Buttersäure, Essigsäure	3,97	3,90—4,07
56	Salzsäure	—	Süß	3,26	2,66—3,41
58	A. I. V.	—	Etwas Essig	3,88	3,57—4,05
59	Defu	0,25	Buttersäure, Essigsäure	4,26	3,82—4,30
60	A. I. V.	—	Gut	2,86	2,76—3,38
61	Defu	0,2	Buttersäure, Essigsäure	3,14	3,09—3,20
62	A. I. V.	—	Gut	2,75	2,58—3,06
63	Defu	0,2	Süß	3,58	3,53—3,62
64	A. I. V.	—	Buttersäure, Essigsäure	3,80	3,77—3,80
67	A. I. V.	—	Etwas, Buttersäure, Azetamid	3,64	3,58—3,70
69	A. I. V.	—	Gut	3,26	3,02—3,59
70	Defu	0,2	Ester, etwas Buttersäure	3,76	3,72—3,81
71	A. I. V.	—	Gut	2,71	2,71—2,97
72	A. I. V.	—	Gut	2,81	2,77—2,91
73	A. I. V.	—	Gut	2,94	2,78—3,06
76	A. I. V.	—	Gut	3,37	3,32—3,38
77	A. I. V.	—	Gut, etwas Essig	3,06	2,92—3,23
78	A. I. V.	—	Buttersäure, Essigsäure	3,22	3,10—3,22
79	Defu + A. I. V.	—	Gut	3,38	3,21—3,39
80	A. I. V.	—	Buttersäure, Essigsäure	3,81	3,81—3,81

[1]) Tiefere Stellen aus demselben Silo.
[2]) Drei Stellen derselben Probe.
[3]) Kleine Rüben.

Tabelle 9.

Milch-säure %	Essig-säure %	Butter-säure %	Milchsäure-bakterien	Buttersäure-bakterien	Cl. tyro-butyricum	Cl. saccharo-butyricum
0,97	0,14	0,47	sehr viele	sehr viele		
0,55	0,23	0,83	keine	sehr viele		
0,06	0,09	0,05	keine	sehr viele		
0,13	0,55	0,86	keine	sehr viele		
0,24	0,21	0,13	keine	keine		
0,12	0,58	1,48	sehr viele	sehr viele	++	—
0,47	0,06	0,04	keine	wenige		
0,55	0,12	0,22	keine	wenige		
—	0,08	0,40	wenige	sehr viele		
0,83	0,15	0,02	keine	wenige		
0,70	0,18	0,58	sehr viele	viele		
0,60	0,45	0,26	sehr viele	wenige		
0,44	0,13	0,13	einzelne	sehr viele		
0,13	0,13	0,05	keine	viele		
0,08	0,69	0,78	sehr viele	sehr viele		
0,23	0,15	0	keine	keine		
0,51	0,15	0	sehr viele	einzelne		
0,63	0,07	0,61	viele	viele		
0,62	0,61	0,18	sehr viele	wenige		
0,65	0,52	0,32	sehr viele	viele		
0,41	0,17	0,46	sehr viele	sehr viele		
1,36	0,27	0	sehr viele	ziemlich viele	—	++
1,07	0,36	0,13	sehr viele	sehr viele	+++	+
0,70	0,29	0,03	sehr viele	viele		
0,46	0,18	0,96	viele	sehr viele		
0,46	0,41	0,17	sehr viele	viele	+++	—
1,58	0,36	0,12	sehr viele	sehr viele	+	—
1,01	0,18	0,10	viele	wenige	+	—
1,38	0,28	0,04	viele	wenige	+	—
0,63	0,63	0,20	sehr viele	viele	+	+
1,51	0,40	0,03	sehr viele	einzelne		
0,34	0,15	0	sehr viele	wenige	—	+
0,42	0,35	0,39	sehr viele	viele	+++	+
0,92	0,21	0,04	viele	ziemlich viele	—	+++
0,55	0,24	0,02	sehr viele	viele	+	++
0,72	0,22	0,54	viele	sehr viele	++	++
0,33	0,14	0,01	sehr viele	viele	—	+++
0,56	0,43	0,11	keine	viele	—	+
0,40	0,07	0,01	keine	einzelne		
1,29	0,25	0	viele	keine		
0,64	0,15	0,40	viele	sehr viele	+++	++
1,07	0,48	0,25	sehr viele	sehr viele	++	—
1,28	0,33	0	sehr viele	keine		
1,84	0,53	0,13	sehr viele	keine		
0,63	0,15	0,01	keine	wenige	—	+
0,62	0,06	0,06	keine	keine		
0,84	0,10	0,005	keine	keine		
1,12	0,38	0,06	viele	ziemlich viele	—	+
0,83	0,16	0,04	keine	einzelne	—	+
1,56	0,15	0,22	sehr viele	ziemlich viele		
0,92	0,24	Spur	sehr viele	wenige		
0,25	0,39	0,29	sehr viele	sehr viele	+	+

Wenn man sich nur die Zahlen der chemischen Analyse ansieht, so würde man eine Tyrobutyricumgärung erwarten in den Silagen: 1, 2, 5, 49, 7 b,

Tabelle 9.

Nummer	Gebrauchte Säure.	Rohrzucker %	Geruch der Silage	p_H im Mittel	p_H variierend von
81	Defu	0,3	Hier und da Essig	3,32	3,28—3,41
83	A. I. V.	—	Buttersäure	3,27	3,10—3,27
84	Defu	0,16	Hier und da Essig	3,74	3,55—3,84
87	A. I. V.	—	Ester	1,67	1,67—1,70
88	A. I. V.	—	Buttersäure	4,05	3,91—4,19
89	A. I. V.	—	Buttersäure, Essigsäure	3,63	3,35—3,76
90	Defu	0,2	—	4,08	4,04—4,19
91	Defu	0,2	Apfel, etwas Buttersäure	2,89	2,89—2,95
92	A. I. V.	—	Ester, etwas Buttersäure	3,02	3,01—3,09
{93	A. I. V.	—	Ester, etwas Buttersäure	3,61	3,61—3,72
{94	A. I. V.[1])	—	Ester, etwas Buttersäure	3,78	3,76—4,03
95	Defu	0,2	Ester, etwas Buttersäure	3,72	3,57—3,82
97	Defu	0,2	Gut, etwas Essigsäure	3,46	3,45—3,53
98	A. I. V.	—	Buttersäure	3,45	3,44—3,48
99	A. I. V.	—	Ester	3,62	3,52—3,73
102	Defu	0,2	Ester, etwas Buttersäure	3,96	3,88—4,01
107	Defu	0,2	Süß	3,7	—

[1]) Randprobe aus demselben Silo.

7 c, 12, 13, 18, 25, 26, 32, 33, 35, 38, 43, 44, 47, 55, 59, 64, 67, 70, 78, 80, 83, 88, 89, 90, 94, 95 und 98.

In diesen ist nämlich der Buttersäuregehalt hoch oder ist das Verhältnis der Milchsäure- zu den Buttersäurezahlen ungünstig.

Keine Buttersäuregärung oder eine Saccharobutyricumgärung ist zu erwarten in den Silagen: 3, 7 a, 11, 16, 22, 27, 34, 37, 46, 50, 53, 56, 58, 60, 62, 63, 69, 71, 72, 73, 76, 77, 79, 84, 87, 92 und 107, weil hier die Buttersäurezahlen niedrig sind (oder sogar 0) und auch die Milchsäurezahlen.

Schwieriger zu beurteilen sind die Proben 6, 14, 45, 61, 81, 91, 93, 97, 99 und 102.

Wir sehen, daß in der ersten Gruppe die Silagen mit p_H oberhalb 3,5 zu finden sind, obwohl es einige Ausnahmen gibt. Auch finden sich hier die meisten Defu-Silagen, vermutlich wegen des höheren p_H-Wertes, aber sicher auch infolge des höheren Zucker- (also Milchsäure-) Gehaltes.

Stimmt die chemische Analyse nun mit der bakteriologischen überein? Man muß Wert legen auf das Vorkommen von Milchsäurebakterien, aber man muß auch bedenken, daß das Fehlen von Milchsäurebakterien nicht immer aussagt, daß Milchsäuregärung nicht stattgefunden hat, denn die Bakterien können inzwischen abgestorben sein. Umgekehrt beweist auch das Vorkommen von Milchsäurebakterien nicht immer eine deutliche Milchsäuregärung, denn eine geringe Entwicklung dieser Bakterien ist fast immer in den Zwischenschichten möglich.

Aus dem Fehlen von Milchsäurebakterien kann man schließen, daß die Silagen 3, 7 a, 7 b, 11, 16, 27, 61, 62, 71, 72, 73, 77, 83, 87, 89, 91 und 92 wahrscheinlich keine Tyrobutyricumgärung hatten. Man sieht aber deutlich, daß man sich hüten muß, auf Grund eines einzelnen Faktors ein Urteil auszusprechen, denn die Nummern 83 und 89 z. B. hatten sicher Tyrobutyricumgärung.

Wichtiger ist die Identifizierung der Buttersäurebakterien, obwohl

Tabelle 9.

Milchsäure %	Essigsäure %	Buttersäure %	Milchsäurebakterien	Buttersäurebakterien	Cl. tyrobutyricum	Cl. saccharobutyricum
0,73	0,25	0,16	sehr viele	viele	+	++
1,35	0,21	0,40	keine	viele	+++	—
2,01	0,76	0,06	sehr viele	wenige	—	+
1,19	0,25	0,02	keine	keine		
0,77	0,19	0,71	viele	sehr viele	+++	+
0,81	0,39	0,51	keine	sehr viele	+++	++
1,11	0,63	0,34	sehr viele	ziemlich viele	+	+
0,46	0,25	0,10	keine	einzelne		
0,64	0,18	0,04	keine	wenige		
1,43	0,37	0,09	viele	viele	—	+
1,25	0,16	0,32	sehr viele	sehr viele	+++	+
0,76	0,57	0,20	sehr viele	sehr viele		
0,72	0,26	0,13	ziemlich viele	viele	—	+++
0,52	0,30	0,30	viele	viele	+	++
1,10	0,27	0,08	sehr viele	keine		
1,26	0,45	0,15	viele	ziemlich viele	+	+
2,17	0,35	0	viele	viele	+++	+

diese Methode wegen Züchtungsschwierigkeiten auch nicht immer zum Ziel führt.

Cl. tyrobutyricum wurde gefunden in den Silageproben: 35, 43, 44, 45, 46, 47, 49, 55, 58, 59, 64, 67, 80, 81, 83, 88, 89, 90, 94, 98, 102 und 107, Cl. saccharobutyricum in 34, 35, 47, 53, 55, 56, 58, 59, 60, 61, 64, 67, 71, 76, 77, 80, 81, 88, 89, 90, 93, 94, 95, 97, 98, 102 und 107. In den Silagen 35, 47, 55, 58, 59, 64, 67, 80, 81, 88, 89, 90, 94, 98, 102 und 107 fanden sich also beide Arten vor. (In den Silageproben mit niedrigen Nummern haben wir die Buttersäurebakterien nicht näher untersucht, weil wir damals noch keine klare Vorstellung über die Wichtigkeit dieser Gruppeneinteilung hatten.)

Obwohl in 46 und 58 Cl. tyrobutyricum gefunden wurde, ist hier doch keine Tyrobutyricumgärung gewesen, denn Buttersäure wurde nicht nachgewiesen. Besonders stark war diese Erscheinung bei der Probe 107. Man ist genötigt anzunehmen, daß das frischgemähte Gras sehr reich an Buttersäurebakterien war. (Düngung mit stark tyrobutyricumhaltigem Mist?)

Selbstverständlich ist für die Tyrobutyricumgärung die p_H-Grenze 3,5 kein absoluter Wert. Wir sahen, daß bei p_H-Werten oberhalb 3,5 in den Mineralsäuresilagen eine beträchtliche Milchsäuregärung auftreten muß. Die Schichtenstruktur ist verantwortlich für Buttersäuregärungen unterhalb 4 und Milchsäuregärung bei mittlerem p_H unterhalb 3,5. Je niedriger der p_H ist, desto schwieriger kann eine Buttersäuregärung auftreten. In der Nähe des p_H-Wertes 3,5 kann man also eine hohe Milchsäurekonzentration bei nur geringer Buttersäuregärung erwarten. Die Bereitungsweise der Silage ist aber verantwortlich für Abweichungen dieser Allgemeinheit.

Betrachten wir z. B. die Silage 83. Bei p_H 3,1 bis 3,27 wurden nur laktatvergärende Buttersäurebakterien gefunden. Die Zahlen der Milchsäure- und Buttersäurekonzentrationen beweisen deutlich, daß Gärungen stattgefunden haben.

Die Nummern 34, 50, 63 und 84 dagegen enthalten kein Cl. tyro-

butyricum, obwohl der p_H oberhalb 3,5 ist. Bei den Silagen 50 und 84 ist ununterbrochen Säure gespritzt worden, so daß die Bedingungen für das Entstehen von nicht-sauren Schichten ungünstig waren. Bei der Silage 34 ist mangels einer Drainierung der Feuchtigkeitsgehalt der Silage hoch geblieben und dadurch die Säurediffusion beschleunigt worden. Bei Nummer 63 ist die Schichtenbildung verhindert durch sehr starke Pressung während der Füllung. Die schlechte Beschaffenheit der Silage 83 kann nur verursacht sein durch die Füllung des Silos in sehr dicken Schichten.

Eine Bestätigung der oben entwickelten Theorie gab uns eine selbst angefertigte Silage in einem kleinen Betonbehälter, gefüllt mit 3000 kg Gras. Die Tab. 10 zeigt die Analysenergebnisse.

Bei der Füllung des Behälters wurden kleine Portionen von nur 30 kg bespritzt mit der Säurelösung (Schwefelsäure und Salzsäure). Betrachtet man nur die Zentrumsproben, so sieht man, daß nur in den oberen Schichten des Behälters Cl. tyrobutyricum gefunden wurde, obwohl hier doch der p_H niedriger war als in den tieferen Schichten. Der geringere Druck hat hier die nicht-sauren Zwischenschichten länger bestehen lassen. Der Randteil enthält Cl. tyrobutyricum noch in tieferen Schichten, hauptsächlich wegen des höheren p_H-Wertes, aber auch weil die Reibung an der Wand das Zusammenpressen der Futtermasse verlangsamt. Am Boden wurden keine Buttersäurebakterien nachgewiesen, weil der Behälter nicht drainiert worden war. Eine dünne Schicht war hier also ganz durchnäßt, wodurch die Inhomogenität, welche Buttersäuregärung erlaubt, hier vermieden wurde.

Im Abschnitt VII haben wir dargelegt, daß es zwei Arten von holländischen Silagen gibt und zwar solche ohne und solche mit Milchsäuregärung. In Silagen der ersten Art kann man keine Tyrobutyricumgärung erwarten, in denjenigen der zweiten Art wird Laktatvergärung wohl geschehen. Die Tab. 11 macht dies ersichtlich.

Zum Schluß wollen wir darauf aufmerksam machen, daß man beim Nach-

Tabelle 10.

Entnahmestelle des Musters Tiefe cm		Geruch	p_H im Mittel	p_H variierend von	Milchsäure %	Essigsäure %	Buttersäure %	Milchsäurebakterien	Buttersäurebakterien	Cl. tyrobutyricum	Cl. saccharobutyricum
50	Zentrum	Fäulnis, Buttersäure	3,48	3,05—4,00	0,38	0,21	0,14	sehr viele	sehr viele	++	++
96	Zentrum	Essigsäure	3,43	3,40—3,50	0,61	0,21	0,04	sehr viele	sehr viele	+++	+
96	Rand	Buttersäure	4,48	3,87—4,70	0,69	0,41	0,36	sehr viele	sehr viele	++	++
125	Zentrum	Apfel	3,44	3,36—3,50	0,63	0,16	Spur	sehr viele	sehr viele	—	+++
125	Rand	Buttersäure, Essig	4,02	3,94—4,07	1,05	0,35	0,04	sehr viele	viele	+	+++
140	Zentrum	Apfel	3,6	—	0,98	0,26	Spur	sehr viele	viele	—	+++
140	Rand	Gut	3,9	—	1,17	0,34	0,05	sehr viele	viele	(+)	+++
Boden	Zentrum	Gut	3,65	—	1,13	0,35	0,06	sehr viele	keine		

weis der Buttersäurebakterien in der mineralsauren Silage in den Röhrchen mit den Traubenzucker-Fleischwasser-Pepton-Böden öfters Gärung beobachtet, welche nicht von Buttersäurebakterien verursacht wird, sondern von einem Bakterium, welches viel Ähnlichkeit aufweist mit dem Bacillus pabuli von Schieblich (siehe Bergey's Manuel). Die Kolonien dieser Art zeigen auch aerobes Wachstum und verflüssigen Gelatine. Sie haben, auf Gelatine gezüchtet, eine Moireestruktur.

Tabelle 11.

	p_H	Milchsäure %	Essigsäure %	Buttersäure %	Buttersäurebakterien	Cl. tyrobutyricum	Cl. saccharobutyricum	Milchsäurebakterien
Rübensilage . . .	4,46	0,46	0,17	0,47	sehr viele	++	++	sehr viele
Bohnen, Mais . .	4,3	0,54	0,75	0,67	sehr viele	+++	—	sehr viele
Grassilage 82 . .	4,53	2,30	0,39	0,82	sehr viele	+++	+	sehr viele
Grassilage 1932 .	4,96				viele	—	+++	keine
Grassilage Sept. '32	5,2				viele	+++	+	sehr viele

E. Ist eine Ensilierung ohne Buttersäuregärung möglich?

Besonders die Buttersäuregärung und die Fäulnisgärung sind Prozesse, welche die Qualität einer Silage verringern. Beide verursachen einen unangenehmen Geruch, aber schlimmer ist es, daß beide die Silage immer stärker verderben. Die Buttersäuregärung (gemeint ist die Laktatvergärung) erhöht den p_H, weil sie die Milchsäure zersetzt; die Fäulnisbakterien tun dasselbe, weil sie Ammoniak produzieren. Fäulnis kann man vermeiden, wenn der p_H genügend niedrig ist (unterhalb 4), Buttersäuregärung (Laktatvergärung) durch sehr hohe Temperatur oder hohen Säuregrad. Hohe Temperatur hat aber den Nachteil, daß die Eiweißstoffe weniger gut vom Tier verwertet werden. Bei einem genügend niedrigen p_H ist also die beste Konservierung zu erwarten und darum hat die Mineralsäuremethode unzweifelbar große Vorteile. Die Ausführungsweise der Virtanenschen Methode (schichtweise Bespritzung) macht aber die Buttersäuregärung nicht unmöglich, wobei bei Silagen im p_H-Gebiete 3,5 bis 4 noch Laktatvergärung zu befürchten ist. Erst bei p_H unterhalb 3,5 scheint die Gefahr der Tyrobutyricumgärung praktisch verschwunden zu sein. Leider kann aber nicht ohne weiteres eine Silage mit solch hohem Säuregrad zu verfüttern empfohlen werden, weil das Vieh dieses Futter nicht gern frißt, selbst nicht nach Neutralisation der Säure mit Kreide oder Bikarbonat und anderseits nach dem Genuß auch Gesundheitsschädigungen auftreten können.

Die Buttersäuregärung im p_H-Gebiet 3,5—4 kann nicht einsetzen, wenn wir dafür Sorge tragen, daß die Silage so homogen wie möglich ist, also keine Schichtenstruktur aufweist. Dieses erreicht man, indem man das Futter gut durchfeuchtet ensiliert und es stark preßt.

Es fragt sich, ob vielleicht bei Anwendung von viel Wasser sogar eine Ensilierung ohne Mineralsäure möglich ist. Die entstandene Milchsäure ist bei hohem Wassergehalt homogen im Silo verteilt. Bedingung ist aber, daß die Milchsäurebakterien den p_H unterhalb 4 bringen sollen. Dieses ist nur möglich, wenn erstens genügend Zucker vorhanden ist und zweitens die Bakterien einen derart hohen Säuregrad zu produzieren vermögen. Zuckermangel tritt auf bei eiweißreichen oder kohlenhydratarmen Gewächsen

aber auch dann, wenn zu viel Luft zwischen dem frisch ensilierten Futter bleibt oder der ursprünglich vorhandene Zucker durch Atmung und mikrobielle Prozesse schnell oxydiert wird. Auch Neutralisierung der gebildeten Säure durch Ammoniakbildung von vielerlei Bakterien darf nicht übersehen werden. Das Wasser aber verhindert viele dieser schädlichen Auswirkungen, weil es Luft vertreibt und die Temperatur niedrig hält. Die Milchsäurebakterien gewinnen dann schnell die Oberhand. Daß Milchsäurebakterien imstande sind, im stark gepufferten Gras einen genügend hohen Säuregrad zu erreichen, ist wohl wahrscheinlich. Viele der von uns isolierten Milchsäurebakterien produzieren im Grasdekokt so viel Säure, daß der p_H 3,4—3,6 war und praktische Versuche mit Ensilierung in gläsernen Behältern zeigten, daß — allerdings mit bestimmten Grasarten — sogar Wasser allein (ohne Zucker) genügte. In vielen Fällen war der p_H der freiwillig gesäuerten Masse 3,9—3,8.

Wenn Sauerstoff Zutritt hat, können sich säurezehrende Mikroorganismen entwickeln (z. B. Kahmhefen). Der Säuregrad sinkt dann und Buttersäuregärung und Fäulnis setzen ein, wie aus Tab. 12 ersichtlich ist. Die Behälter wurden aufbewahrt bei 28° C.

Tabelle 12.

Anzahl Tage	Obere Hälfte			Untere Hälfte		
	p_H	Milchsäure %	Buttersäure %	p_H	Milchsäure %	Buttersäure %
7	4,34	1,18	Spuren	4,03	1,35	0
15	4,78	0,94	0,20	4,07	1,07	0
51	5,68	0,09	1,66	5,87	0,12	1,62
79	5,65	—	—	5,93	—	—

Aus dieser Tabelle geht hervor, daß die Silage gut vor Luftzutritt geschützt werden soll. Besonders deutlich sieht man auch, wie in der Silage allmählich die Milchsäure durch Buttersäure ersetzt wird.

Zusammenfassung.

1. Die Buttersäuregärung im ensilierten Futter ist vom Standpunkte der Käsebereitung wichtig, weil Buttersäurebakterien die Käsequalität schädigen können. Auch in Mineralsäure-Silagen kann Buttersäuregärung auftreten, denn in der Mehrzahl der von uns analysierten Silagen dieser Art wurde Buttersäure nachgewiesen, sogar in Silagen vom p_H-Wert unterhalb 3. Buttersäurebakterien sind immer ohne Schwierigkeiten aus diesen Silagen zu züchten. Praktische Käsereiversuche jedoch bewiesen, daß nur die Silagen mit p_H oberhalb 3,5 gefährlich für die Käsebereitung sind, obwohl auch in den verfütterten Silagen mit p_H unterhalb 3,5 viele Buttersäurebakterien gefunden wurden, ohne daß diese Silagen Käseblähung verursachten.

Wir haben versucht klarzulegen, wie es möglich ist, daß Buttersäuregärung bei so niedrigem p_H auftritt und warum für die Käsereigefährlichkeit der p_H-Wert von ungefähr 3,5 als Grenzwert erscheint.

2. Die auf dem frischen Grase haftenden Buttersäurebakterien-Sporen bleiben in den Mineralsäure-Silagen am Leben und können darin keimen und sich entwickeln, also eine Buttersäuregärung verursachen, wie ein gewisser Buttersäuregehalt der Silage beweist. Diese Gärung muß vor sich gehen bei einem mittleren p_H der Silage unterhalb 4.

3. Die Säureresistenz der Buttersäurebakterien-Sporen ist ziemlich hoch; sie sterben erst ab bei p_H-Werten unterhalb 3,5 und, je niedriger der p_H ist, desto schneller. Aus Versuchen mit Traubenzucker-Pepton-Fleischwasser und Salzsäure konnten wir schließen, daß die Entwicklung der Buttersäurebakterien ausblieb, wenn der p_H-Wert unterhalb 4,0—4,2 war.

Milchsäurebakterien können sich in Grassilagen mit Mineralsäure noch entwickeln, wenn der p_H-Wert oberhalb 3,5 ist. Wenn also der p_H einer Mineralsäure-Silage 3,5 oder darüber ist, kann man erwarten, daß Milchsäuregärung stattgefunden hat. Theoretisch gibt es also im p_H-Gebiet drei bis vier 2 Arten von Silage, nämlich Silagen mit und ohne Milchsäuregärung.

4. Buttersäuregärung und Milchsäuregärung können auftreten bei p_H-Werten unterhalb 4 bzw. 3,5, weil die Mineralsäure-Silage eine „geschichtete Struktur" aufweist. Bei der Bereitung wird das Futter nicht mit der Säure gemischt, sondern es werden nur die Oberflächen der Futterschichten bespritzt. In den nicht mit Säure benetzten Schichten sind also Gärungen zu erwarten, bis die Säurediffusion ein Weiterfortschreiten der Gärung hemmt. Es folgt hieraus, daß diese Gärungen um so stärker sind, je dicker die bespritzten Futterschichten sind, je trockener das Futter ist und je weniger bei der Füllung der Behälter gepreßt wurde.

5. Es gibt zwei Hauptarten von nicht-verflüssigenden Buttersäurebakterien. Cl. tyrobutyricum ist imstande Laktate zu vergären, Cl. saccharobutyricum nicht. Das letztere ist darum ungefährlich für die Käserei. In einer Silage mit Milchsäuregärung kann sich Cl. tyrobutyricum entwickeln und in einer Silage ohne Milchsäuregärung nur Cl. saccharobutyricum. Nur in Mineralsäure-Silagen mit mittlerem p_H-Wert oberhalb ungefähr 3,5 findet eine schnelle und beträchtliche Milchsäuregärung statt und in solchen Silagen findet man also die besten Verhältnisse für eine Tyrobutyricum-Gärung. Es muß jedoch betont werden, daß in mit weniger Sorgfalt bereiteten Silagen (z. B. dicke Schichten) auch bei mittlerem p_H unterhalb 3,5 Tyrobutyricum-Gärung nachgewiesen werden kann und daß bei so homogen wie möglich bereiteten Silagen (wo also die geschichtete Struktur fehlt) keine Tyrobutyricum-Gärung stattfindet bei p_H-Werten zwischen 3,5 und 4.

6. Beim holländischen Feimenverfahren tritt immer Buttersäuregärung auf. Wenn aber Milchsäurebakterien fehlen (hohe Temperatur bei der Bereitung), sind die aus der Silage gezüchteten Buttersäurebakterien nur vom Typus Cl. saccharobutyricum. Wenn die Silage aber Milchsäurebakterien enthält, werden auch Buttersäurebakterien vom Typus Cl. tyrobutyricum gefunden.

7. Bei der bakteriologischen Wertbestimmung einer Silage soll man bestimmen: Milchsäure, Buttersäure, p_H, Milchsäurebakterien, Buttersäurebakterien (Cl. tyrobutyricum und Cl. saccharobutyricum). Die Milchsäurebestimmung kann jedoch unterbleiben, weil die Möglichkeit der Laktatvergärung bestanden haben kann und infolgedessen ein geringer Milchsäuregehalt nicht beweist, daß keine Milchsäuregärung stattgefunden hat.

8. Buttersäuregärung kann in einer Silage mit genügend hohem Säuregrad nur mit Erfolg unterdrückt werden, wenn die Silage gleichmäßig ist. Dieses kann man bei der Mineralsäure-Methode erreichen durch Ensilierung stark und gut durchfeuchteten Futters. Vielleicht ist auch möglichst allein bei Gebrauch von viel Wasser, also ohne Mineralsäurezusatz, eine gute Silage zu bereiten.

Nachdruck verboten.

Der Vitaminbedarf der Milchsäurebakterien.

[Aus dem biotechnisch-chemischen Laboratorium der dänischen technischen Hochschule. Vorstand: Prof. Dr. S. Orla-Jensen.]

Von S. Orla-Jensen, N. C. Otte und Agnete Snog-Kjær.

Mit der Entdeckung, in welch hohem Maße die ganze Lebenstätigkeit von Katalysatoren, die teils aktivierend, teils regulierend wirken, abhängt, ist in der Physiologie eine neue Epoche entstanden. Die Katalysatoren können kaum nachweisbare Spuren gewisser Metallsalze oder kompliziertere Stoffe, wie Koenzyme, Hormone oder Vitamine sein. Diese Tatsachen sind nicht nur bezüglich der höheren Organismen festgestellt, sondern es ist auch bewiesen, daß gewisse Hefearten in rein synthetischen Substraten mit Ammoniaksalzen als einziger Stickstoffquelle nicht wachsen, wenn nicht ein Aktivator, das sog. Bios, den Substraten zugesetzt wird. Die erforderliche Biosmenge ist jedoch so unbedeutend, daß sie zugeführt wird, wenn man nur mit einer einigermaßen normalen Hefemenge impft. Nach Untersuchungen von Williams und Sanders[1]) besteht Hefebios aus 3 Bestandteilen, Inosit, B_1-Vitamin und einer noch nicht näher bekannten sehr thermostabilen Säure, welche sie pantothenic acid genannt haben. Dieser letztere Bestandteil ist der wichtigste. Neuerdings hat W. H. Schopfer gezeigt[2]), daß Phycomyces nicht ohne B_1-Vitamin wächst, und der betreffende Schimmelpilz kann somit zum Nachweis von B_1-Vitamin benutzt werden.

Unter den Bakterien trifft man bekanntlich die verschiedenartigsten Ansprüche an die Nahrung. Von den autotrophen Bakterien, die sich wie die grünen Pflanzen mit rein anorganischer Nahrung begnügen können, kommt man mit den Bakterien als Zwischenglied, die sich wohl mit anorganischer Stickstoffnahrung benügen können, die aber organische Kohlenstoffnahrung haben müssen, zu den Bakterien, die sowohl organische Stickstoff- wie Kohlenstoffnahrung beanspruchen. Von den letzteren scheinen einzelne sogar noch wählerischer als die höheren Tiere zu sein, indem sie scheinbar nur in ganz bestimmten natürlichen Substraten wachsen. Im Hinblick auf die erwähnten Entdeckungen entsteht aber die Frage, ob die Ursache, weshalb ein Bakterium sich nur in einem ganz bestimmten Substrat entwickeln kann, dem Gehalt dieses Substrates an wirklichen Nährstoffen oder an Aktivatoren zuzuschreiben sei. Möglicherweise ist die Lösung dieser Frage von entscheidender Bedeutung für das aktuelle Virus- und Bakteriophagenproblem.

Wir haben es versucht, die Frage zu lösen bezüglich der echten Milchsäurebakterien, die an die Stickstoffnahrung scheinbar ebenso große Ansprüche wie die höheren Tiere stellen, und auch für geringe Zuschüsse von aktivierenden Stoffen sehr dankbar sind. In früheren Arbeiten haben wir bereits gezeigt, daß die Entwicklung gewisser Milchsäurebakterien in der Milch gefördert wird nur durch den Zusatz von $^1/_{40}$ ‰ Hefeautolysat[3]).

---

[1]) The Biochemical Journ. Vol. 28. 1934. No. 5. p. 1887.

[2]) Ztschr. f. Vitaminforschung. Bd. 4. 1935. S. 187.

[3]) Orla-Jensen, S., und Jacobsen, Johanne, Neue Untersuchungen über die bakteriziden Eigenschaften der Milch. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 80. 1930. S. 326.)

Umgekehrt haben wir gezeigt, daß andere Milchsäurebakterien, die in reinem Hefeautolysat gut wachsen, noch besser gedeihen, wenn dem Autolysat Milch zugesetzt wird[1]). Dies deutet darauf, daß nicht nur Hefeautolysat Aktivatoren enthält, die nicht in Milch vorkommen, sondern daß auch das Umgekehrte der Fall sei. In anderen Arbeiten hat S. Orla-Jensen gezeigt, daß verschiedene Milchsäurebakterien außerstande sind, Zucker zu vergären, ohne die Gegenwart gewisser aldehydartiger Aktivatoren, die jedoch normalerweise gebildet werden, wenn der Zucker mit den stickstoffhaltigen Nährstoffen zusammensterilisiert wird[2]).

Was uns in diesem Zusammenhang besonders interessiert, ist, ob die Tatsache, daß viele Milchsäurebakterien, die Milch als Nährsubstrat vorziehen, ihrem Gehalt an besonders für sie geeigneten Nährstoffen oder für sie notwendigen Aktivatoren, oder vielleicht der Vereinigung beider Ursachen zuzuschreiben sei. Als mögliche Aktivatoren kommen in erster Linie die Vitamine der Milch in Betracht, und von diesen können wir sofort von den fettlöslichen absehen, weil die Milchsäurebakterien ebensogut in abgerahmter Milch wie in Vollmilch gedeihen. Von den wasserlöslichen Vitaminen können wir ferner von dem wenig thermoresistenten C-Vitamin absehen, weil die Milchsäurebakterien meistens eher besser als schlechter in erhitzter Milch wachsen. Es kommen somit nur die Vitamine der B-Gruppe in Betracht, von denen sowohl das antineuritische B_1-Vitamin und das antipellagrische B_2-Vitamin in der Milch nachgewiesen sind. Das B_2-Vitamin ist weit thermoresistenter als das B_1-Vitamin und gehört zu einer Gruppe von orangen, grünlich fluoreszierenden Farbstoffen, den Flavinen, wovon speziell das Laktoflavin der Molke ihre Fluoreszenz verleiht[3]). Da neuere Untersuchungen gezeigt haben, daß Flavine für sich allein Pellagra nicht heilen können, muß das B_2-Vitamin noch einen anderen Faktor enthalten, das Vitamin B_6, welches vielleicht mit dem Hauptbestandteil des Bios, der wenig alkaliempfindlichen pantothenic acid verwandt ist.

Mit Ausnahme von B_6 oder Bios sind sonst alle bekannten wasserlöslichen Vitamine (im Gegensatz zu den fettlöslichen Vitaminen) alkaliempfindlich, und es lag daher nahe zu prüfen, ob Milch durch Erwärmung mit Alkali ein schlechterer Nährboden für die Milchsäurebakterien werde. Leider läßt sich in der Milch so wenig wie in anderen zuckerhaltigen Flüssigkeiten eine mäßige Alkalität während des Erhitzens erhalten. Um B-Vitamine vollständig zu zerstören, muß man deshalb wiederholt Alkali zusetzen. In dem Versuch, dessen Ergebnisse in der Tab. 1 zusammengefaßt sind, wurde die Milch zuerst auf den p_H 8 eingestellt und $\frac{3}{4}$ Std. auf 100° C in strömendem Wasserdampf erhitzt, dann wieder durch Alkalizusatz auf den p_H 8 eingestellt, $\frac{1}{4}$ Std. auf 115° C und noch einen Moment auf 120° C erhitzt. Durch diese Sterilisation wurde so viel Säure gebildet, daß der p_H der Milch 6,8 war. Durch Zusatz von 1‰ Cysteinhydrochlorid oder einer entsprechenden Menge Salzsäure wurde die Milch auf p_H 6,5 gebracht, derselbe p_H, den die

[1]) Orla-Jensen, S., Orla-Jensen, Anna D., und Spur, B., The butter aromabacteria. (Journ. of Bacteriology. Vol. 12. 1926. p. 333.)

[2]) Die Abhängigkeit der Milchsäuregärung von der Art und Weise, in welcher die Sterilisierung der Nährböden ausgeführt wird. Bericht des internationalen milchwirtschaftlichen Kongresses in Kopenhagen 1931. Hitherto unknown activators for the growth of lactic acid bacteria. (Journ. of the Society of Chemical Industry. Vol. 52. 1933. p. 374.)

[3]) Richard Kuhn hat eine treffliche Übersicht über die Eigenschaften der Flavine im Bericht des internationalen Chemikerkongresses, Madrid 1934, gegeben.

gleiche Milch, ohne Alkalizusatz sterilisiert, zeigte. Der Zusatz von Cystein zu einem Teil der alkalibehandelten Milch wurde gemacht für den Fall, daß etwas von dieser leicht zersetzbaren Aminosäure bei der Alkalibehandlung zerstört worden wäre. Da von unseren Milchsäurebakterien die Thermobakterien die anspruchsvollsten sind, wurden zu diesem Versuch lediglich solche verwendet. Die gebildete Säure, die wir stets als $^0/_{00}$-Milchsäure berechnen, wurde nach 2tägiger Bebrütung bei 37° C bestimmt.

Tabelle 1.

Milch		Bakterienart				
alkalibehandelt	mit Cysteïnzusatz	Tbm. intestinale[1]) 314	Tbm. lactis 10	Tbm. bulgaricum 14	Tbm. helveticum 12	Tbm. Jugurt 13
ja	nein	1,6	5,0	14,2	15,8	16,2
ja	ja	2,7	8,3	14,2	18,5	18,2
nein	nein	5,0	12,2	16,4	18,9	21,8

[1]) In Übereinstimmung mit der Arbeit von Orla-Jensen, S., Orla-Jensen, Anna D., und Winther, O., Bacterium bifidum und Thermobacterium intestinale. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. 1936, Bd. 93. S. 321—343) benennen wir Bacillus acidophilus Thermobacterium intestinale.

Wie man sieht, wird die Milch durch die Alkalibehandlung ein schlechterer Nährboden für die Thermobakterien. Die geprüften Arten reagieren jedoch nicht gleich stark darauf. Die 2 ersten reagieren recht stark, während die 3 letzten nur schwach reagieren, ja gegenüber Tbm. helveticum läßt sich der verursachte Schaden allein durch den Cysteinzusatz beheben. Durch noch kräftigere Alkalibehandlung wird die Milch zu einem noch schlechteren Nährboden für die Milchsäurebakterien, was jedoch nicht beweist, daß diese Bakterien alkaliempfindliche Aktivatoren benötigen, denn das schlechte Gedeihen der Milchsäurebakterien in solcher Milch kann ebensogut von den tiefgehenden chemischen Veränderungen, welche die Behandlung verursacht, herrühren.

Wir mußten deshalb versuchen, auf andere Weise die Milch ihrer B-Vitamine zu berauben. Da sowohl B_1-Vitamin wie B_2-Vitamin sich an Fullererde oder aktive Kohle (Norritkohle) adsorbieren lassen, haben wir versucht, die Milch mit aktiven Kohlen zu schütteln. Wir zogen aktive Kohle der Fullererde vor, weil letztere nicht chemisch inaktiv ist, indem Milch mit Fullererde erhitzt alkalisch wird. Bei neutraler Reaktion soll vorzugsweise das B_1-Vitamin, und bei stark saurer Reaktion vorzugsweise das B_2-Vitamin adsorbiert werden. Wir haben die natürliche Reaktion der Milch ($p_H = 6{,}5$) benutzt, weil ein Zusatz von Säure die Milch zur Gerinnung bringt. Zu 1 l abgerahmter Milch haben wir 20 g Norritkohle verwendet. Mittels eines Rührapparates wurde die Mischung eine ganze Stunde gerührt, um die Adsorption so vollständig wie möglich zu machen. Da die Kohlen sehr fein gemahlen sind, und Partikelchen enthalten, die nicht größer als Bakterien sind, können sie nicht wieder von der Milch abfiltriert, sondern nur mittels kräftiger Zentrifugierung entfernt werden. Zu diesem Zweck haben wir Heines Bakterienzentrifuge verwendet. Dieselbe, mit sechs Bechern aus rostfreiem Stahl versehen, erlaubte uns, 4 l Milch jedesmal zu

behandeln. Wenn nach und nach die maximale Schnelligkeit von 3600 Umdrehungen in der Minute erreicht war, ließen wir die Zentrifuge noch ¼ Std. laufen. In dieser Weise wurde jede Portion Milch zweimal behandelt, nur wurde nach dem Umrühren mit dem zweiten Kohlenzusatz die Mischung in strömendem Wasserdampf auf 100° C erhitzt, um die feinen Kohlenpartikelchen von anhaftender Luft zu befreien, wodurch ihre Adsorptionsfläche wie auch ihr spezifisches Gewicht vergrößert wird. Das letztere bezweckt, daß sie leichter ausgeschleudert werden. Da die zweifache Behandlung Zeit nimmt, ist die keimtötende Wirkung der Erwärmung auch von Bedeutung. Während die Keimzahl der Milch durch die erste Zentrifugierung stark abnimmt, steigt sie wieder sehr schnell, wenn man die Erhitzung der Milch unterläßt.

Aus der Tab. 2 ersieht man, daß die Milch durch die beschriebene Behandlung wirklich zu einem schlechten Nährboden der Milchsäurebakterien, der Stäbchen wie der Streptokokken, gemacht wird. Nach Impfung wurde die Milch immer bei der Optimaltemperatur der betreffenden Arten aufgestellt. Diese ist 37° für die Thermobakterien und für Streptococcus thermophilus und 30° C für die Mehrzahl der übrigen Milchsäurebakterien.

Tabelle 2.

Milch	Bakterienart													
	Tbm. lactis 10	Tbm. bulgaricum	Tbm. helveticum	Sbm. casei 11		Sc. thermophilus 7	Sc. cremoris 18		Sc. cremoris 215		Sc. lactis 22		Sc. lactis 33	
Nichtkohlenbehandelt	14,7	17,3	21,6	5,4	6,8	6,2	5,4	6,0	5,4	6,3	5,4	5,9	5,0	5,9
Kohlenbehandelt	1,1	2,6	0,5	0,7	0,8	1,5	0,7	0,8	0,7	0,8	0,2	0,2	0,7	0,9
Titriert nach Anzahl Std.	50	50	50	120	175	50	50	74	50	74	74	98	50	74

Kein Tierversuch kann in besserer Weise als obige Tabelle die Bedeutung der Vitamine illustrieren. Die geprüften Bakterien sind alle solche, die mit Vorliebe in Milch wachsen. Von den eigentlichen Nährstoffen derselben, haben wir, wie eine Analyse zeigte, durch die Kohlenbehandlung nichts entfernt. Der Stickstoffgehalt der Milch war freilich um 0,03—0,04% vermindert worden. Dies rührt jedoch weniger von der Adsorption, als von der scharfen Zentrifugierung her, wodurch Leukozyten, Mikroorganismen und andere relativ große Partikelchen ausgeschleudert wurden. Da die Adsorption bei p_H 6,5 vorgenommen wurde, muß man von vornherein annehmen, daß hauptsächlich das B_1-Vitamin entfernt worden ist. Versuche mit Molke zeigen indessen, daß bei diesem p_H die Kohlen auch das Laktoflavin adsorbieren, denn die Molke wird völlig entfärbt.

Zur Herstellung der aktivierenden Stoffe geht man besser von enteiweißter Molke, als von normaler Milch aus. Hier kann man bei jeder Wasserstoffionenkonzentration arbeiten, das Adsorbat wird reiner, und die Kohlen können einfach abfiltriert werden. Um ausfindig zu machen, was die Kohlen von der Milch entfernt hatten, mußten wir auch mit der Molke die Adsorption

bei p_H 6,5 vornehmen. Die erste Frage war, ob wir zur Eluierung Salzsäure oder Pyridin verwenden sollten. Mit starken Säuren eluiert man am besten das B_1-Vitamin und mit schwachen Basen das Laktoflavin, und diese beiden Aktivatoren müßten im Absorbat zu finden sein. Es zeigte sich bald, daß zur Reaktivierung der kohlenbehandelten Milch das Pyridineluat am wirksamsten war. Das beste Verfahren war folgendes: Die Kohle mit dem Adsorbat wurde 3mal mit Wasser gewaschen und darauf 1 Std. mit einer Mischung von gleichen Teilen Pyridin und Methylalkohol verrührt. Die Flüssigkeit wurde abfiltriert und die Kohle wieder mit der gleichen Mischung und ebensoviel Wasser 1 Std. gerührt. Das zweite Filtrat wird mit dem ersten vereinigt, mit Salzsäure auf p_H 6 eingestellt und im Vakuum bei 40—55° C eingedampft, wodurch die Lösung von Pyridin und Methylalkohol befreit wird. Es ist notwendig, ein paarmal etwas Wasser zuzusetzen und die Operationen im Dunkeln auszuführen. Ausgeschiedene Verunreinigungen werden abfiltriert. Das braune, grünlich fluoreszierende Eluat riecht noch nach Pyridin. Die letzten Pyridinreste können durch wiederholtes Eindampfen im Vakuum nach Zusatz von Wasser entfernt werden, was jedoch die aktivierenden Stoffe etwas abschwächt und für unsere Zwecke überflüssig ist, weil die Milchsäurebakterien nach unseren Untersuchungen erst von 0,5%, ja, was einzelne Arten betrifft, sogar erst von 1% Pyridin geschädigt werden. Es ist nicht leicht festzustellen, wieviel von den aktivierenden Stoffen während der Herstellung verlorengeht. Rechnet man mit keinem Verlust, so sollte in dem Versuch, dessen Ergebnisse in der Tab. 3 zusammengestellt sind, 0,75% unseres Eluats die kohlenbehandelte Milch reaktivieren können. Wir haben derselben 0,5 und 1% zugesetzt.

Tabelle 3.

Nährsubstrat	% Eluat zugesetzt	Kohlen-behandelt	Bakterienart													
			Tbm. intestinale 314		Tbm. lactis 10		Tbm. bulgaricum		Tbm. helveticum		Sc. cremoris 18		Sc. cremoris 215		Sc. lactis 33	
Milch	0	ja	1,6	3,2	0,7	2,7	2,0	3,4	0,7	4,1	0,7	1,1	0,9	1,4	1,4	2,3
	0,5	,,	3,2	6,8	2,9	10,1	9,7	14,0	3,8	11,3	2,5	4,7	3,4	6,3	2,9	5,2
	1	,,	4,7	7,9	3,4	12,8	11,7	14,9	5,6	14,2	3,4	6,1	5,4	7,0	3,4	5,4
	0	nein	5,2	9,7	7,2	15,3	11,3	18,0	12,8	21,4	4,3	7,4	6,5	7,2	4,3	6,3
Molke	0	ja	0,1	0,1	0,1	0,2	0,7	1,1	0,1	0,5	0,2	0,5	0,1	0,2	0,2	0,5
	2	,,	0,5	0,5	0,3	0,7	2,5	3,8	0,9	2,9	0,9	2,0	0,9	1,4	1,1	1,6
	0	nein	0,9	1,8	0,9	0,9	5,2	8,8	0,7	2,7	0,9	2,0	1,6	1,8	2,5	4,3
Titriert nach Anzahl Std.			48	96	24	96	24	96	24	96	24	96	48	96	24	96

Diese Tabelle zeigt, daß die kohlenbehandelte Milch durch Zusatz von dem in der beschriebenen Weise bereiteten Eluat ein wesentlich besseres Nährsubstrat für die Milchsäurebakterien wird. Mit 1% des Eluates bilden die Streptokokken beinahe ebensoviel Säure in der kohlenbehandelten wie in der nicht-kohlenbehandelten Milch, für die Thermobakterien (besonders Tbm. helveticum) scheint dagegen dieser Zusatz noch nicht hoch genug zu sein. Selbst die doppelte Menge des Eluats war noch nicht ausreichend. Es ist deshalb anzunehmen, daß bei der Herstellung des Eluats etwas der für die Thermobakterien notwendigen Aktivatoren verlorengeht.

Von einem Teil der zu diesem Versuch verwendeten Milch haben wir enteiweißte Säuremolke hergestellt. Eine solche ist, wie wir in einer späteren Arbeit näher besprechen werden, kein guter Nährboden für die Milchsäurebakterien, und sie wird durch Kohlenbehandlung selbstverständlich nicht besser. Auch hier wirkt der Zusatz von unserem Eluat günstig, nur ist das Bild weniger deutlich als mit der Milch, weil die Milchsäurebakterien (mit Ausnahme von Tbm. bulgaricum) überhaupt wenig Säure in der Molke bilden.

Nach Angaben in der Literatur haben wir versucht, von Molke Präparate herzustellen, die reich an B_1-Vitamin und arm an B_2-Vitamin waren, und umgekehrt Präparate, die reich an B_2-Vitamin und arm an B_1-Vitamin waren, und es zeigte sich stets, daß zur Reaktivierung der kohlenbehandelten Milch gegenüber den Milchsäurebakterien die laktoflavinreichen Präparate am besten wirkten. Am deutlichsten lagen die Verhältnisse bei einigen Präparaten, die uns die Medizinalfabrik Ferrosan in Kopenhagen freundlichst überließ, und welche durch Rattenversuche von Dr. Krieger-Lassen kontrolliert waren. Die Stärke derselben wurde angegeben:

B_2-vitaminfreies B_1-Vitamin, pro g = 20 kurative Rattendosen
ungefähr 100 γ reinem Vitamin entsprechend
B_1-vitaminfreies B_2-Vitamin, pro g = 1,25 kurative Rattendosen
ungefähr 12,5 γ reinem Vitamin entsprechend

Da diese Präparate nicht aus Milch, sondern aus Hefe hergestellt worden waren, lag die Möglichkeit vor, daß sie auch das alkalifeste, thermoresistente Bios enthielten, und sie wurden deshalb nicht nur im ursprünglichen Zustande, sondern auch nach einer ähnlichen Alkalibehandlung wie die Milch in unserem ersten Versuch (Tab. 1), der kohlenbehandelten Milch zugesetzt. Da die Präparate sehr sauer waren, mußten sie vor dem Zusatz neutralisiert werden. Das B_1-Präparat konnte nicht in größeren Dosen als 1% der Milch zugesetzt werden, ohne dieselbe bei der Sterilisierung zu koagulieren. Die Titrierung fand statt nach 5 Tagen.

Tabelle 4.

Milch	% Präparat zugesetzt	$^0/_{00}$ N mit dem Präparat zugesetzt	γ Vitamin auf 100 ccm Milch zugesetzt	Das Präparat alkalibehandelt	Bakterienart: Tbm. lactis 10	Tbm. helveticum	Sbm. casei 11	Sc. thermophilus 7	Sc. cremoris 18	Sc. cremoris 215	Sc. lactis 22
Kohlenbehandelt	0	0	0	nein	0,2	0,6	0,3	0,2	0,5	0,2	0,2
„	0,5 B_1	0,07	50	„	0,8	3,2	2,5	3,8	2,9	3,0	2,3
„	1,0 „	0,13	100	„	1,0	5,0	3,0	4,2	4,3	3,0	2,6
„	1,0 „	0,13	?	ja	0,8	5,0	3,0	4,2	3,4	1,4	2,6
„	0,5 B_2	0,14	6,3	nein	1,6	6,3	7,9	6,8	6,3	5,0	5,4
„	1,0 „	0,29	12,5	„	3,4	8,1	9,9	7,2	7,0	5,9	6,5
„	2,0 „	0,58	25	„	3,6	11,9	13,1	7,9	7,6	6,8	6,8
„	4,0 „	1,15	50	„	12,1	20,0	13,3	9,1	7,6	7,6	7,4
„	4,0 „	1,15	?	ja	7,2	12,8	11,3	9,5	8,3	8,1	8,1
Nichtkohlenbehandelt	0	0	0		13,8	21,2	9,5	6,9	7,3	6,1	7,1

Laut angegebener Stärke der Vitaminpräparate setzt man mit 0,5% des B_1-Präparates ebensoviel Vitamin zu der Milch wie mit 4% des B_2-Prä-

parates. Da, wie die Tab. 4 zeigt, der erstere Zusatz nur eine äußerst schwache Wirkung hat, während der letztere Zusatz genügt, um die kohlenbehandelte Milch gegenüber den Milchsäurebakterien zu reaktivieren, kann man nicht mehr daran zweifeln, daß für diese Bakterien das B_2-Vitamin oder das darin vorhandene Laktoflavin eine weit größere Rolle spielt als das B_1-Vitamin. Zwar war das B_2-Präparat ungefähr doppelt so stickstoffhaltig als das B_1-Präparat, so daß wir der Milch mehr Nährstoff mit dem ersten als mit dem letzten zuführten. Dies kann jedoch nach unseren Erfahrungen keine so große Wirkung ausüben, und selbst im Verhältnis zur zugesetzten Stickstoffmenge fällt der Vergleich zugunsten des B_2-Präparates aus.

Da die B-Vitamine und ganz besonders das B_1-Vitamin leicht durch Erhitzung mit Alkali zerstört wird, haben die Ergebnisse mit den alkalibehandelten Präparaten großes Interesse. Da die Wirkung des B_1-Präparates durch die Alkalibehandlung fast überall unverändert geblieben ist, rührt die aktivierende Wirkung desselben offenbar gar nicht von B_1-Vitamin, sondern von etwas darin vorhandenem Bios her. Das B_2-Präparat erleidet dagegen durch die Alkalibehandlung eine Abschwächung seiner aktivierenden Wirkung gegenüber den stäbchenförmigen Milchsäurebakterien, und eine Verstärkung dieser Wirkung gegenüber den Streptokokken. Auch in diesem Präparat scheint das Bios die Hauptsache zu sein, es enthält jedoch noch einen alkaliempfindlichen Aktivator, wahrscheinlich das Laktoflavin, der jedenfalls für die stäbchenförmigen Milchsäurebakterien von Bedeutung ist. Wenn die Streptokokken mit dem alkalibehandelten B_2-Präparat mehr Säure bilden als mit dem nicht-alkalibehandelten, kann die Erklärung nur die sein, daß dieses Präparat auch noch hemmende Stoffe enthält, die durch Erhitzung mit Alkali zerstört werden. Hefeautolysat zeigt genau dasselbe Verhalten.

Da Bios[1]) auch von aktiven Kohlen — und zwar recht unabhängig vom vorhandenen p_H — adsorbiert wird, liegt es nach obigem Versuch nahe, anzunehmen, daß das von Molke hergestellte aktivierende Eluat Bios enthalten muß. Da Bios indessen in der Milch bis jetzt nie nachgewiesen ist, ist es notwendig zu untersuchen, ob unser Eluat das Wachstum der Hefe beschleunigen könne.

Die diesbezügliche Untersuchung ist von dem Hefespezialisten des hiesigen Laboratoriums, Herrn Carl le Dous, ausgeführt worden. 8 verschiedene Hefearten, die bei schwacher Impfung in rein synthetischen Substraten nicht wachsen, wurden geprüft. Es waren 2 Brauereihefen (1 Münchnerhefe und Carlsberg Unterhefe Nr. 2), 2 Weinhefen (Portwein und Chateau Margaux), 1 kubanische Rumhefe, der in der Rumfabrikation so wichtige ameisensäurebildende Schizosaccharomyces mellacei, und 2 zitronenförmige Apiculatus-Hefen (der nicht-sporenbildende Saccharomyces apiculatus Emil Chr. Hansen, und 1 sporenbildende Art von Vogelbeeren). Diese Hefearten wurden in äußerst geringer Menge in eine 15proz. Rohrzuckerlösung mit 0,2% saurem phosphorsaurem Ammoniak, 0,2% saurem phosphorsaurem Kali und 0,1% schwefelsaurer Magnesia, geimpft. Ferner wurden sie in die gleiche Lösung, die noch 0,01% N entweder in Form von Hefeautolysat, nicht-alkalibehandeltem Eluat oder alikalibehandeltem Eluat enthielt. Wir haben das bioshaltige Hefeautolysat zum Vergleich herangezogen.

[1]) Unter Bios verstehen wir nur pantothenic acid. Die zwei Begleitstoffe Inosit und B_1-Vitamin haben, wie wir später beweisen werden, keine Bedeutung für die Milchsäurebakterien.

In der Zuckerlösung ohne Aktivatorzusatz zeigte keine der geprüften Hefearten nach 3 Wochen bei 20° C Wachstum. In der Zuckerlösung mit Aktivatorzusatz bekamen wir dagegen stets sowohl Wachstum wie Gärung. Mit Hefeautolysat wuchsen sie alle nach 2—3 Tagen und mit dem nicht-alkalibehandelten Eluat nach 2—5 Tagen. Mit dem alkalibehandelten Eluat fing das Wachstum 1—2 Tage später an, wahrscheinlich weil das darin vorvorhandene B_1-Vitamin zerstört worden war. Eine Ausnahme bildet jedoch die kubanische Rumhefe, die mit Hefeautolysat und nicht-alkalibehandeltem Eluat erst nach 2 Wochen, und mit alkalibehandeltem Eluat erst nach 3 Wochen zu wachsen begann. Dieses Untersuchungsergebnis spricht dafür, daß in der Milch eine biosähnliche Substanz vorkommt, die gegenüber den Hefen eine ähnliche wachstumfördernde Wirkung ausübt wie das Bios des Hefeautolysates.

Um zu beweisen, daß die alkaliempfindliche Substanz, die neben dem Bios in unserem Eluat vorkommt, auch wirklich — wofür alles spricht — Laktoflavin sei, war es notwendig, uns diesen Stoff in reinem kristallinischem Zustande zu verschaffen, und wir sind deslhab dem Prof. R. Kuhn sehr zu Dank verpflichtet, weil er uns eine für die Durchführung unserer Untersuchungen genügende Menge Laktoflavin, aus Leber hergestellt, freundlichst überlassen hat.

Aus den Versuchen mit den Vitaminpräparaten von Ferrosan ging hervor, daß 500 γ oder 0,5 mg B_2-Vitamin genügt um 1 l kohlenbehandelte Milch zu reaktivieren. Wir verwenden deshalb im folgenden zu 1 l kohlenbehandelter Milch 0,5 mg Laktoflavin und das Eluat von 2 l Molken, weil die Erfahrung uns gezeigt hat, daß wir bei der Herstellung des Eluats mit recht großen Verlusten rechnen müssen. In dem Versuch, dessen Ergebnisse in den Tab. 5 a und b zusammengefaßt sind, wurden sowohl nicht-alkalibehandeltes wie alkalibehandeltes Eluat verwendet. Die aktivierenden Bestandteile des letzteren müssen hauptsächlich Bios sein, weil, wie es aus den späteren Tab. 7 a und b hervorgeht (man vergleiche Bios allein mit Bios + alkalibehandeltem Laktoflavin), die Erwärmung mit Alkali, wie wir sie ausführen, genügt, um das Laktoflavin fast vollständig zu zerstören.

Tabelle 5 a.

Milch	Zusatz	Eluat alkalibehandelt	Bios	Laktoflavin des Eluats	Reines Laktoflavin	Bakterienart: Tbm. lactis 9		Tbm. lactis 10		Tbm. bulgaricum		Tbm. helveticum	
Kohlenbehandelt	kein					0,2	0,2	0,3	0,3	0,5	0,9	0,5	0,9
,,	Laktoflavin				+	0,3	0,6	0,3	0,5	0,6	1,1	0,5	0,9
,,	Eluat	ja	+			5,2	7,7	0,5	1,0	1,8	4,5	2,3	4,5
,,	,,	nein	+	+		7,9	9,9	0,5	1,0	5,7	11,0	3,2	9,0
,,	Laktoflavin + Eluat	ja	+		+	9,2	14,2	1,4	5,9	5,9	13,5	5,2	9,0
,,	Laktoflavin + Eluat	nein	+	+	+	10,8	16,2	6,3	12,2	10,6	16,6	13,7	20,5
Nichtkohlenbehandelt	kein					14,9	19,6	10,8	16,2	7,9	16,4	17,3	23,6
Titriert nach Anzahl Stunden						46	118	46	118	19	118	46	118

Tabelle 5 b.

Milch	Zusatz	Eluat alkalibehandelt	Bios	Laktoflavin des Eluats	Reines Laktoflavin	Bakterienart							
						Sbm. casei 11		Sc. thermophilus 7		Sc. cremoris 18		Sc. lactis 22	
Kohlenbehandelt	kein					0,2	0,2	0,1	0,3	0,3	0,5	0,3	0,5
,,	Laktoflavin				+	0,1	0,2	0,1	0,2	0,3	0,5	0,2	0,5
,,	Eluat	ja	+			0,1	0,2	1,6	4,5	4,1	5,9	2,3	3,4
,,	,,	nein	+	+		2,3	2,5	2,3	5,2	3,4	5,4	1,6	3,4
,,	Laktoflavin + Eluat	ja	+		+	0,9	1,1	1,8	5,9	3,6	7,0	3,6	4,7
,,	Laktoflavin + Eluat	nein	+	+	+	8,6	10,8	2,5	5,9	4,3	7,2	5,0	5,6
Nichtkohlenbehandelt	kein					4,7	5,6	3,6	6,3	5,4	8,3	6,3	7,2
Titriert nach Anzahl Stunden						118	160	23	118	19	118	46	140

Aus diesen Tabellen ersieht man, daß Laktoflavin für sich allein nicht imstande ist, die Milchsäurebakterien zu aktivieren, dies vermag dagegen in den meisten Fällen Bios allein (alkalibehandeltes Eluat). Ausnahmen bilden Tbm. lactis 10 und Sbm. casei 11. Die kräftigste Aktivierung bekommt man jedoch mit Laktoflavin + Bios. Mit diesen beiden Aktivatoren bilden die geprüften Bakterien fast ebensoviel Säure in der kohlenbehandelten Milch (ja Sbm. casei 11 sogar doppelt soviel Säure) wie in der nicht-kohlenbehandelten Milch. Gegenüber den meisten Milchsäurebakterien wirkt das nicht-alkalibehandelte Eluat kräftiger als das alkalibehandelte, und sucht man hierfür die Ursache natürlich im Gehalt des ersteren an Laktoflavin. Dies mag auch ein mitwirkender Faktor sein, dort, wo Laktoflavin nicht zugesetzt ist. Hat man indessen 0,5 mg/l Laktoflavin zugesetzt, reicht diese Erklärung nicht mehr aus, weil diese Laktoflavinmenge + Bios genügt, um der kohlenbehandelten Milch ihre maximale Aktivität wieder zu geben. Aus den Tab. 7a und b geht nämlich hervor, daß man sogar mit der 3fachen Laktoflavinmenge keine höhere Säurebildung hervorrufen kann. Man muß deshalb annehmen, daß bei der Alkalibehandlung des Eluats auch noch andere Aktivatoren als das Laktoflavin zerstört werden. Aktivatoren, die für die einzelnen Arten der Milchsäurebakterien verschiedenen Wert haben. Ob das B_1-Vitamin, das jedenfalls bei der Alkalibehandlung zerstört wird, für die Milchsäurebakterien eine Rolle spielt, ist nach dem vorhergehenden kaum wahrscheinlich.

Mit diesem Versuch ist festgestellt, daß die Milchsäurebakterien wenigstens 2 Aktivatoren nötig haben, nämlich Bios und Laktoflavin. Die Zahlen der Tabellen zeigen deutlich, daß die stäbchenförmigen Milchsäurebakterien (ganz besonders Tbm. lactis 10 und Sbm. casei 11) mehr Laktoflavin als die Streptokokken beanspruchen. Diese letzteren bilden (besonders Sc. thermophilus) fast ihre maximale Säuremenge mit der im verwendeten Eluat vorhandenen Laktoflavinmenge.

Im vorhergehenden haben wir unser Bios bei einem p_H der Molke von 5—6,5 adsorbiert. Man braucht hier nicht sehr genau einzustellen, weil kleinere Schwankungen der Wasserstoffionenkonzentration keinen Einfluß auf die Wirksamkeit unseres Eluats ausüben. Ein etwas kräftiger wirkendes

Eluat bekommt man dagegen, wenn man bei einem p_H um 0 herum adsorbiert, weil es dann reicher an Laktoflavin wird. Was wir in den Tab. 6a und b neutrales, normales und saures Eluat nennen, sind Eluate, die bei p_H 7 bzw. 5,8 und 0 adsorbiert sind. Das erste Adsorbat wurde mittels Salzsäure, wie man es bei der Herstellung von B_1-Vitamin tut, und die zwei anderen Adsorbate wurden in unserer gewöhnlichen Weise mittels Pyridin eluiert. Von jedem der Eluate wurde der kohlenbehandelten Milch gleich viel (nach der Stickstoffmenge berechnet) zugesetzt.

Tabelle 6 a.

Milch	Zusatz	Bakterienart: Tbm. lactis 9		Tbm. lactis 10		Tbm. bulgaricum		Tbm. helveticum	
Kohlen-behandelt	kein	0	0,5	0,2	0,2	0,2	0,9	0	0,8
,,	neutrales Eluat	1,4	7,9	2,3	2,3	1,0	2,5	0,7	4,7
,,	normales Eluat	4.5	10,6	1,6	2,0	4,1	5,6	1,1	5,9
,,	saures Eluat	5,0	11,3	0,9	1,5	5,9	9,0	1,4	8,6
,,	neutrales Eluat + Laktoflavin	2,3	11,9	6,1	7,7	5,4	13,3	1,8	11,7
,,	normales Eluat + Laktoflavin	6,8	15,1	8,8	10,4	10,6	18,2	5,2	17,1
,,	saures Eluat + Laktoflavin	7,9	14,6	10,6	13,4	11,7	18,0	7,7	18,0
Nichtkohlen-behandelt	kein	4,1	14,6	11,0	12,7	9,5	16,0	4,5	19,6
Titriert nach Anzahl Std. .		18	96	66	96	18	96	18	96

Tabelle 6 b.

Milch	Zusatz	Bakterienart: Sbm. casei 11		Sc. thermophilus 7		Sc. cremoris 18		Sc. lactis 22	
Kohlen-behandelt	kein	0	0	0,1	0,7	0	0,6	0,2	0,2
,,	neutrales Eluat	0,6	1,4	3,2	4,3	2,9	6,3	3,8	3,8
,,	normales Eluat	1,1	2,5	2,7	5,6	2,9	6,3	3,6	5,4
,,	saures Eluat	1,8	2,6	2,5	6,5	2,9	5,0	3,4	3,7
,,	neutrales Eluat + Laktoflavin	0,5	1,6	2,9	5,6	3,8	6,8	5,0	5,1
,,	normales Eluat + Laktoflavin	4,1	9,9	2,7	6,8	4,5	7,4	5,9	6,1
,,	saures Eluat + Laktoflavin	5,0	8,0	2,5	6,8	3,4	6,8	5,9	6,3
Nichtkohlen-behandelt	kein	1,6	3,9	3,2	6,1	4,3	8,1	5,9	6,0
Titriert nach Anzahl Std. .		66	96	21	96	18	96	66	96

Aus diesen Tabellen ersieht man, daß das sog. neutrale Eluat, welches besonders reich an B_1-Vitamin ist, schlechter als die zwei anderen Eluate wirkt. Bei den Streptokokken wirken jedoch die Eluate fast gleich gut, weil diese Bakterien so wenig Laktoflavin benötigen, und bei Tbm. lactis 10 und Sbm. casei 11 ist die Wirkung derselben fast gleich schwach, weil die darin vorhandene Laktoflavinmenge zu gering ist, um diese 2 Arten aktivieren zu können. Wenn man der Milch außer Eluat noch Laktoflavin (die gewöhnliche Menge 0,5 mg/l) zusetzt, gleichen sich die vorhandenen Unterschiede meistens aus. Jedenfalls wirken dann das normale und das

saure Eluat meistens gleich gut, während das neutrale Eluat, das biosärmer zu sein scheint, nicht immer dieselbe aktivierende Wirkung besitzt. Dies macht sich besonders bei Sbm. casei 11 geltend.

Die Tatsache, daß Laktoflavin ein notwendiger Faktor für die Entwicklung der Milchsäurebakterien ist, steht im Einklang mit den Untersuchungen von O. Warburg und W. Christans[1]). Diese Forscher haben gezeigt, daß Bacillus Delbrückii (Thermobacterium cereale Orla-Jensen) reich an Laktoflavin ist, und daß das gelbe Ferment, dessen tätiger Bestandteil das Laktoflavin ist, unter anaeroben Bedingungen eine sauerstoffübertragende Rolle für die Milchsäurebakterien spielt. Die Übereinstimmung zwischen unseren Versuchsresultaten und dieser Auffassung ist um so größer, weil es sich gezeigt hat, daß der Bedarf an Laktoflavin viel größer bei den streng anaeroben Milchsäurestäbchen als bei den weniger anaeroben Streptokokken ist.

Von anderer Seite ist das Glutathion als ein notwendiger Faktor für die Milchsäuregärung betrachtet worden, und es dürfte deshalb von Interesse sein zu untersuchen, ob Laktoflavin durch Glutathion ersetzt werden kann. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in den Tab. 7a und b zusammengestellt. Gleichzeitig haben wir untersucht, ob Laktoflavin, aus Milch hergestellt, ganz die gleiche Wirkung gegenüber den Milchsäurebakterien ausübt wie das bisher verwendete Laktoflavin aus Leber. Auch das Milch-Laktoflavin verdanken wir Herrn Prof. R. Kuhn. Zu diesen Untersuchungen wurde das gleiche „normale" Eluat in derselben Menge wie im vorigen Versuch benutzt. Wenn die gebildeten Säuremengen nichtsdestoweniger nicht übereinstimmen, rührt es daher, daß wir nicht die gleiche Milch verwendet haben. Schwer zu erklären ist die relativ große Säuremenge, welche Tbm. lactis 10 und die relativ geringe Säuremenge, welche Sc. lactis 22 mit Bios allein gebildet haben. Dies zeigt jedenfalls, daß der bisher beobachtete Unterschied im Laktoflavinbedarf zwischen den Stäbchen und den Streptokokken nur ein gradueller ist.

Tabelle 7a.

Milch	Eluat	Andere Zusätze mg/l	Bakterienart							
			Tbm. lactis 9		Tbm. lactis 10		Tbm. bulgaricum		Tbm. helveticum	
Nichtkohlenbehandelt			7,4	18,2	9,2	14,4	9,7	16,7	18,2	23,2
Kohlenbehandelt	Bios	+ 1,5 Leber-Laktoflavin	6,5	12,4	6,5	11,9	9,5	15,3	16,0	20,3
,,	,,	+ 0,5 Leber-Laktoflavin	6,5	12,2	5,4	11,9	9,7	15,5	16,0	18,9
,,	,,	+ 0,5 Milch-Laktoflavin	7,0	13,5	9,2	13,3	9,9	15,5	15,8	19,8
,,	,,	+ 0,5 Milch-Laktoflavin alkalibehandelt	5,0	10,4	5,2	8,1	7,9	10,1	8,3	13,5
,,	,,		4,3	9,9	5,2	8,1	7,4	10,6	6,1	9,7
,,	,,	+ 0,5 Glutathion	4,7	10,8	3,4	3,8	5,9	10,1	8,3	13,5
,,	,,	+ 2,0 ,,	4,3	11,0	2,7	4,1	6,8	9,0	5,6	13,1
,,	,,	+ 200,0 ,,	5,6	11,0	1,0	3,6	8,6	11,3	7,9	11,9
,,	,,	+ 2000,0 ,,	5,0	10,8	1,5	4,7	9,0	11,9	9,0	14,0
,,		200,0 ,,	0,2	1,6	0,9	1,4	0,7	2,0	1,1	2,0
,,		2,0 ,,	0,1	0,9	0,6	0,9	0,7	1,8	0,6	1,4
,,			0	0,2	0,3	0,7	0,3	0,9	0,9	1,1
Titriert nach Anzahl Stunden			18	90	42	90	18	90	42	90

[1]) Über das gelbe Ferment und seine Wirkungen. (Biochem. Ztschr. Bd. 266. 1933. S. 378.)

Tabelle 7 b.

Milch	Eluat	Andere Zusätze mg/l	Bakterienart							
			Sbm. casei 11		Sc. thermophilus 7		Sc. cremoris 18		Sc. lactis 22	
Nichtkohlenbehandelt			7,0	13,5	5,6	6,1	6,8	7,9	5,6	6,3
Kohlenbehandelt	Bios	+ 1,5 Leber-Laktoflavin	7,2	14,2	4,7	5,6	5,9	6,8	4,3	5,0
„	„	+ 0,5 Leber-Laktoflavin	7,4	14,2	5,0	5,6	5,9	6,8	4,3	5,2
„	„	+ 0,5 Milch-Laktoflavin	7,9	14,6	4,7	5,6	6,1	6,8	4,5	5,2
„	„	+ 0,5 Milch-Laktoflavin alkalibehandelt	3,6	6,5	4,7	5,4	5,2	5,4	1,8	2,5
„	„		3,6	6,8	4,5	5,0	4,5	5,4	1,1	1,6
„	„	+ 0,5 Glutathion	3,8	7,0	5,4	6,1	5,4	5,6	2,7	2,9
„	„	+ 2,0 „	3,4	6,5	5,0	5,9	5,4	6,8	2,3	2,9
„	„	+ 200,0 „	5,0	8,8	5,6	6,1	5,4	6,5	2,9	3,8
„	„	+ 2000,0 „	5,4	9,0	5,0	6,1	4,5	6,3	3,2	4,7
„		200,0 „	1,6	3,8	1,6	2,7	0,2	0,6	0,7	1,1
„		2,0 „	1,4	2,9	1,4	1,8	0,2	0,7	0,2	0,7
„			0,9	2,3	1,1	1,8	0,1	0,7	0	0,1
Titriert nach Anzahl Stunden			65	118	42	90	42	90	42	90

Die Tab. 7 a und b zeigen, daß die in allen früheren Versuchen verwendete Laktoflavinmenge (0,5 mg/l) ausreicht, denn durch Zusatz der 3fachen Menge erreicht man keine höhere Säurebildung. Dagegen scheint das Milch-Laktoflavin einzelne der Thermobakterien (besonders Tbm. lactis 10) etwas kräftiger zu aktivieren, als das Leber-Laktoflavin es tut. Der Unterschied ist jedoch so gering, daß man sich eher über die gute Übereinstimmung wundern muß. Durch Alkalibehandlung wird das Laktoflavin zerstört. Nur gegenüber Tbm. helveticum ist merkwürdigerweise noch eine Wirkung desselben zu spüren, indem wir hier mit Bios + alkalibehandeltem Laktoflavin höhere Säuremengen erhielten als mit Bios allein.

Die Tabellen zeigen deutlich, daß als Aktivator für die Milchsäurebakterien sich Laktoflavin nicht durch Glutathion ersetzen läßt, auch nicht, wenn man von letzterem verhältnismäßig große Mengen verwendet. Glutathion allein ohne Bios hat, wie Laktoflavin allein, keine oder nur eine äußerst geringe Wirkung. Glutathion mit Bios zusammen ergibt meistens etwas mehr Säure, als man mit Bios allein erhält. Eine nennenswerte Wirkung, die jedoch nicht mit der Wirkung von Laktoflavin zu vergleichen ist, erhält man erst gegenüber einzelnen der Milchsäurebakterien (Tbm. bulgaricum, Sbm. casei und Sc. lactis), wenn man sehr große Glutathionmengen, 200—2000 mg/l, verwendet. Bei solchen Mengen spielt das Glutathion aber eine Rolle als Stickstoffnahrung. Das interessanteste Resultat ist vielleicht, daß das Glutathion die Entwicklung gewisser Milchsäurebakterien hemmen kann. Dies ist der Fall bei Tbm. lactis 10, das selbst mit geringen Mengen Glutathion und Bios weniger Säure bildet als mit Bios allein. Da eben dieses Bakterium relativ große Mengen Laktoflavin verlangt, ist es ganz klar, daß Laktoflavin als Aktivator für die Milchsäurebakterien nicht durch Glutathion ersetzt werden kann.

Um einen Begriff davon zu bekommen, wie reich die Milch an den untersuchten Aktivatoren ist, haben wir die Säurebildung unserer Milchsäure-

bakterien in verschiedenen Mischungen der gleichen Milch in kohlenbehandeltem und in nicht-kohlenbehandeltem Zustande bestimmt. Um Unterschiede in der Milch einzelner Kühe auszuschließen, verwendeten wir zu diesem Versuch die Mischmilch einer großen Molkerei.

Die Tab. 8 zeigt, daß selbst 50% nicht-kohlenbehandelte Milch in vielen Fällen noch nicht genügt, um kohlenbehandelte Milch zu reaktivieren, d. h. daß die Kuhmilch in der Tat keinen nennenswerten Überschuß an für die Milchsäurebakterien notwendigen Aktivatoren enthält. Wir haben gefunden, daß 0,5 mg Laktoflavin in 1 l Milch notwendig ist, um maximale Säurebildung zu erhalten und nach Angaben von R. Kuhn liegt die Laktoflavinmenge in 1 l Kuhmilch nicht höher als 0,5—1 mg. Die Farbe der Molke entspricht meistens der letzteren Menge. Es ist deshalb anzunehmen, daß, wenn hie und da die Milch einzelner Kühe schlecht säuert, dies von einem zu geringen Aktivatorgehalt herrührt. Wahrscheinlich haben wir auch hierin die Erklärung, weshalb die Ziegenmilch sich zur Herstellung von Sauermilchprodukten weniger eignet als die Kuhmilch.

Die Tab. 8 zeigt gleichzeitig die aktivierende Wirkung von Hefeautolysat, Tomatenpüree und Malzextrakt, die nach Kuhn alle reich an Laktoflavin sind. Malzextrakt (Evers) wirkt besonders aktivierend gegenüber Tbm. intestinale, Tbm. lactis und Sbm. casei. Daß größere Mengen Malzextrakt auf Sc. thermophilus ungünstig wirken, rührt daher, daß dieses Bakterium größere Zuckermengen nicht vertragen kann[1]). In allen Fällen wurde nach 5 Tagen titriert.

Tabelle 8.

Kohlenbehandelte Milch %	Andere Bestandteile	Bakterienart									
		Tbm. intestinale 314	Tbm. lactis 10	Tbm. bulgaricum	Tbm. helveticum	Sbm. casei 11	Sc. thermophilus 7	Sc. cremoris 18	Sc. cremoris 215	Sc. lactis 22	Sc. lactis 33
100	+ 0% nichtkohlenbehandelte Milch	0,7	4,3	2,5	2,3	1,4	4,3	0,5	3,2	2,3	2,7
99	+ 1% nichtkohlenbehandelte Milch	1,1	5,6	5,0	4,7	1,4	4,5	0,5	4,1	2,5	3,2
90	+ 10% nichtkohlenbehandelte Milch	3,2	11,3	9,9	14,9	2,7	5,4	0,8	5,2	4,5	4,5
75	+ 25% nichtkohlenbehandelte Milch	4,5	13,3	16,2	18,5	6,1	5,9	3,2	5,9	5,9	5,4
50	+ 50% nichtkohlenbehandelte Milch	4,5	13,3	16,9	18,5	8,6	6,8	6,3	6,1	5,9	6,3
0	+ 100% nichtkohlenbehandelte Milch	4,5	13,3	18,0	22,7	9,5	6,8	6,8	6,3	7,2	7,0
99	+ 1% Hefeautolysat	7,2	8,1	6,3	12,6	5,6	5,6	1,8	5,9	6,8	6,1
90	+ 10% Hefeautolysat	7,2	7,2	14,4	15,8	8,8	6,5	7,9	7,2	6,5	7,2
99	+ 1% Tomatenpüree	6,1	5,6	12,2	11,5	7,9	6,1	1,1	5,0	6,1	5,4
99	+ 1% Malzextrakt	7,4	12,2	11,5	12,6	7,7	6,3	2,9	5,2	6,1	5,4
90	+ 10% Malzextrakt	16,4	16,0	16,7	16,2	12,8	5,4	7,0	7,2	8,3	6,1

In der kohlenbehandelten Milch in Verbindung mit bestimmten Arten von Milchsäurebakterien wie Tbm. lactis 10 und Sbm. casei 11

[1]) Orla-Jensen, S., The Lactic Acid Bacteria. (Ber. d. Dänischen Gesellschaft d. Wissenschaften. 1919. S. 13.)

hat man, wie wir auch in der folgenden Arbeit sehen werden, ein einfaches Mittel zum Nachweis von Bios und Laktoflavin. Wenn solche Milch durch den Zusatz eines Stoffes, wie die soeben geprüften (Hefeautolysat. Tomatenpüree oder Malzextrakt) reaktiviert wird, enthält dieser Stoff die beiden genannten Aktivatoren. Wird sie aber nur reaktiviert, wenn man ihr gleichzeitig mit dem Stoff Bios oder Laktoflavin zusetzt, so enthält der Stoff nur Laktoflavin oder Bios.

Zusammenfassung.

1. Die echten Milchsäurebakterien benötigen zu ihrer Entwicklung eine thermostabile, alkalifeste Substanz, die an aktive Kohlen bei allen Wasserstoffionenkonzentrationen innerhalb des sauren Gebietes adsorbiert wird, und die ähnlich wie Laktoflavin leicht mit Pyridin und Methylalkohol eluiert werden kann. Da diese Substanz das Wachstum der Hefe begünstigt, ist sie ohne Zweifel mit dem Hauptbestandteil des Bios, der pantothenic acid, identisch. Viel spricht dafür, daß dieser in der Milch vorkommende Aktivator ebenfalls mit B_6 identisch ist, d. h. daß B_2-Vitamin aus Bios und Laktoflavin besteht.

2. Außer Bios erfordern die echten Milchsäurebakterien Laktoflavin in wechselnden Mengen, die Stäbchenformen 0,5 mg/l, während die Streptokokken sich mit weniger begnügen können.

3. Als Aktivator für die Milchsäurebakterien kann Laktoflavin nicht durch Glutathion ersetzt werden.

Der Vitaminbedarf verschiedener Bakterien außerhalb der Gruppe der Milchsäurebakterien der Milch.

[Aus dem biotechnisch-chemischen Laboratorium der dänischen technischen Hochschule, Vorstand Professor Dr. S. Orla-Jensen.]

Von **S. Orla-Jensen, N. C. Otte** und **Agnete Snog-Kjær.**

In der vorigen Arbeit haben wir nur den Vitaminbedarf der echten Milchsäurebakterien der Milch näher studiert. Viele Milchsäurebakterien gedeihen indessen besser in anderen Nährsubstraten als in der Milch und viele Bakterien der Coli- und Aërogenesgruppe wachsen sogar in rein synthetischen Substraten, und beanspruchen vielleicht deshalb andere oder gar keine Aktivatoren. In dieser Arbeit haben wir das Säurebildungsvermögen sowohl in nicht-kohlenbehandelter wie in kohlenbehandelter Milch der in der Tabelle 1 genannten Bakterien geprüft. Von diesen kommen Streptobacterium plantarum, Betacoccus arabinosaceus und die Aërogenesbakterien in säuernden Pflanzenteilen vor, während Bacterium bifidum, Bacterium acidi propionici, Streptococcus faecium, Streptococcus glycerinaceus, Streptococcus liquefaciens, Betacoccus bovis, Microbacterium lactis und die Colibakterien in Fäzes und Kot vorkommen. Streptococcus mastitidis ist der einzige pathogene Streptokokkus, der gut in Milch wächst.

Tabelle 1.

Bakterienart	Milch		Titriert nach Anzahl Stunden
	nichtkohlen-behandelt	kohlen-behandelt	
Streptobacterium plantarum 23	11,5	0,7	192
Streptobacterium plantarum 30	8,3	0,2	192
Betabacterium breve 3	1,4	0	120
Bacterium bifidum S 5	3,2	0	192
Bacterium bifidum O 16	14,2	0,5	118
Propionibacterium technicum 16	9,7	0,1	192
Streptococcus mastilidis 5	5,4	0,3	192
Streptococcus mastilidis 9	5,9	0,2	192
Streptococcus mastilidis 12	5,4	0	192
Streptococcus faecium 1	4,3	0,6	192
Streptococcus faecium 8	5,4	0,5	192
Streptococcus faecium 11	4,7	0,1	192
Streptococcus faecium 19	5,0	0,1	192
Streptococcus glycerinaceus 1	4,3	0,2	192
Streptococcus liquefaciens 1	6,5	1,0	192
Betacoccus arabinosaceus 16	1,4	0,1	120
Betacoccus bovis 36	6,1	0,3	120
Tetracoccus (Pediococcus) 2	5,2	0,3	192
Tetracoccus pyogenes aureus 13	3,8	0	192
Tetracoccus pyogenes albus 29	1,5	0	168
Microbacterium lacticum 4	1,4	1,4	120
Microbacterium lacticum 5	1,8	2,0	168
Bacterium coli 5	3,6	3,6	24
Bacterium coli 7	3,8	3,6	24
Bacterium coli 9	4,1	3,6	24
Bacterium coli 10	4,1	4,1	24
Bacterium aerogenes 2	3,6	3,4	24
Bacterium aerogenes 3	2,5	2,7	94
Bacterium aerogenes 4	3,8	2,3	45
Bacterium prodigiosum 7	2,9	0,7	192
Bacterium prodigiosum 8	2,5	0	192
Bacterium fluorescens liquef. 1	1,1	0,1	192
Bacillus mesentericus 7	0,5	1,4	192

Aus der Tabelle 1 ersieht man, daß die geprüften echten Milchsäurebakterien — Stäbchen wie Streptokokken — das Propionsäurebakterium und die Tetrakokken (d. h. die säurebildenden, grampositiven Mikrokokken) alle besser in der nicht-kohlenbehandelten als in der kohlenbehandelten Milch gedeihen, und deshalb die Vitamine, welche an der Kohle adsorbiert werden, nötig haben. Dies scheint dagegen nicht der Fall bei Microbacterium lacticum und den Coli- und Aërogenesbakterien zu sein. Der Ausschlag ist natürlicherweise nicht sehr deutlich, wenn die Bakterien selbst in der normalen Milch nicht viel Säure bilden können. Auch Bacterium prodigiosum und Bacterium fluorescens liquefaciens bilden mehr Säure in der nicht-kohlenbehandelten als in der kohlenbehandelten Milch, während das umgekehrte mit den Heu- und Kartoffelbazillen der Fall ist. Wir haben von dieser letzten Bakteriengruppe mehrere Stämme als den in der Tabelle aufgeführten geprüft. Dieser Stamm interessierte uns indessen besonders, weil er ein viel stärkeres Peptonisierungsvermögen in der kohlenbehandelten als in der nicht-kohlenbehandelten Milch zeigte. Dasselbe ist auch der Fall bei den fluoreszierenden Bakterien

und, obwohl kaum so deutlich, bei Bacterium prodigiosum. Die Erklärung dieser Erscheinung dürfte die sein, daß das Laktoflavin, welches in der nicht-kohlenbehandelten Milch vorkommt, auf die Proteolyse schwach hemmend wirkt. Wir haben dies mittels der von Holger Jörgensen näher beschriebenen Gelatinemethode[1]) zeigen können.

Die Farbstoffbildung vieler Bakterien wird vom Vitamingehalt der Nährböden beeinflußt. So bilden die Mikrokokken, welche imstande sind, Milch mehr oder weniger zu säuern, stets mehr Farbstoff in nicht-kohlenbehandelter als in kohlenbehandelter Milch. Am deutlichsten tritt dies hervor, wenn man aus diesen Milchsorten Schrägagar herstellt und darauf Strichkulturen anlegt. Als gute Beispiele dienen die roten Mikrokokken des Camembertkäses und Tetracoccus aureus. Sarcina flava, welche die Milch alkalisch macht, bildet dagegen gleich kräftige chromgelbe Beläge, gleichgültig, ob die Milch B-Vitamine enthält oder nicht. Die fluoreszierenden Bakterien Bacterium fluorescens liquefaciens sowohl wie Bacterium pyocyaneum bilden mehr Farbstoff in nicht-kohlenbehandelter als in kohlenbehandelter Milch. Interessanterweise verhält sich das typische Bacterium prodigiosum umgekehrt, indem es die kräftigste Farbstoffbildung in der kohlenbehandelten Milch zeigt. In den Milchkulturen sieht man dies schon in der ersten Generation, auf Schrägagar dagegen meistens erst in der zweiten Generation, dann bilden aber auch viele Stämme einen ganz weißen Belag auf Agar mit normaler Milch und einen sehr kräftig roten Belag auf Agar mit kohlenbehandelter Milch. Da, wie bekannt, Bact. prodigiosum seinen Farbstoff auf dem laktoflavinreichen Hühnereiweiß bildet, kann es nicht das Laktoflavin, sondern eher das Bios der Milch sein, welches das Ausbleiben der Farbstoffbildung verursacht. Dies deutet darauf hin, daß für Bact. prodigiosum das Prodigiosin die gleiche Rolle wie das Bios spielt. Wenn es von letzterem genug hat, braucht es das erstere nicht zu erzeugen. Bekanntlich verliert Bact. prodigiosum beim Fortzüchten im Laboratorium leicht das Farbstoffbildungsvermögen, ein Mittel dagegen wird zweifelsohne sein, Substrate zu verwenden, die möglichst wenig Bios enthalten.

Da die Farbstoffe der fluoreszierenden Bakterien eine äußerliche Ähnlichkeit mit den Flavinen haben, liegt es nahe zu untersuchen, ob sie vielleicht Flavine seien. Gemäß der vorigen Arbeit kann diese Aufgabe mittels der kohlenbehandelten Milch gelöst werden. Während kohlenbehandelte Milch mit Laktoflavin versetzt zum Nachweis von Bios benutzt werden kann, kann solche Milch mit Bios versetzt zum Nachweis von Laktoflavin benutzt werden, wenn sie mit geeigneten Milchsäurebakterien, am besten Thermobacterium lactis 10 oder Streptobacterium casei 11, geimpft wird.

Zu diesen Versuchen haben wir eine Woche alte, durch Autoklavieren sterilisierte Milchkulturen von Bacterium fluorescens liquefaciens und Bacterium pyocyaneum benutzt. Die zur Züchtung dieser Bakterien verwendete Milch war in unserem ersten Ver-

[1]) Über die Natur der Bromatwirkung. (Das Mühlenlaboratorium. Monatliche Beilage zur Wochenschrift „Die Mühle". Jahrg. 72. 1935. S. 4.) Wir haben es zweckmäßig gefunden, 6 statt 4% Gelatine zu verwenden und dann das Papaïn und Laktoflavin in verschiedenen Mengen 1 Std. bei 70° C anstatt bei 40° C einwirken zu lassen. 70° C liegt nicht nur näher der Optimaltemperatur des Papaïns als 40° C, sondern man erreicht auch hierdurch eine Pasteurisierung, welche den Zusatz von Antiseptika überflüssig macht.

such (Tabelle 2) nicht-kohlenbehandelt, weil die Bakterien hier scheinbar mehr Farbstoff als in kohlenbehandelter Milch bilden. In unserem zweiten Versuch wurde jedoch auch diese letztere Milch verwendet, um zu vermeiden, etwas von der Milch herrührendes Bios oder Laktoflavin zu übertragen.

Tabelle 2.

Nährlösung		Bakterienart			
		Tbm. lactis 10		Sbm. casei 11	
Nichtkohlenbehandelte Milch		2,3	15,1	5,0	11,9
Kohlen-behandelte Milch	Ohne Zusatz	0,2	0,7	0,3	0,5
	Mit Bios	0,9	6,1	1,8	3,6
	„ „ + 5% Kultur von Bact. fluor. liquefaciens	5,4	15,3	9,5	16,2
	„ „ + 5% Kultur von Bact. pyocyaneum	8,1	15,8	10,1	17,1
	„ „ +20% Kultur von Bact. pyocyaneum	11,3	15,5	11,5	18,7
Titriert nach Anzahl Stunden		20	140	68	140

Aus der Tabelle 2 ersieht man, daß der Zusatz von Bios und etwas von einer Kultur eines fluoreszierenden Bakteriums die geprüften Milchsäurestäbchen kräftig zur Säurebildung anregt. Dies beweist, daß das Bakteriofluoreszein ein Flavin ist. Die Säurebildung geht anfangs sogar schneller vor sich in der kohlenbehandelten Milch mit diesen Zusätzen als in der nichtkohlenbehandelten Milch. Nach längerer Zeit gleicht sich, was Tbm. lactis 10 betrifft, die Säuremenge aus, während sie, was Sbm. casei 11 betrifft, stets höher bleibt in der mit Fluoreszein versetzten Milch. Letzteres Bakterium vermag nämlich mit der geringen Laktoflavinmenge, welche in normaler Milch vorkommt, meistens nicht die größtmögliche Säuremenge zu erzeugen.

Im folgenden Versuch, dessen Resultate in der Tabelle 3 zusammengestellt sind, haben wir auch Kulturen der fluoreszierenden Bakterien ohne Bios und ohne Bios aber mit Laktoflavin versucht, um zu sehen, ob diese Bakterien auch Bios bilden.

Aus der Tabelle 3 geht hervor, daß das Fluoreszein ohne Bios nur in geringem Maße Tbm. lactis 10 zum Wachstum und damit zur Säurebildung anzuregen vermag, und dies auch nicht, wenn Laktoflavin zugesetzt wird. Die fluoreszierenden Bakterien erzeugen demnach kaum nennenswerte Mengen von Bios. Das Ergebnis ist weniger deutlich, was Sbm. casei 11 betrifft, weil die Streptobakterien viel weniger Bios als die Thermobakterien benötigen. Aus der Tabelle geht ferner hervor, daß, wenn der kohlenbehandelten Milch die in normaler Milch vorkommende Biosmenge zugesetzt wird, darin von Tbm. lactis 10 bereits mit 2,5% Kultur der fluoreszierenden Bakterien mehr Säure als mit 0,5 mg/l Laktoflavin und mit 5% Kultur (besonders von Bact. pyocyaneum) ebensoviel Säure wie in nicht-kohlenbehandelter Milch gebildet wird. Unter denselben Bedingungen wird darin von Sbm. casei 10 noch viel mehr Säure als in nicht-kohlenbehandelter Milch gebildet. Die Kulturen der fluoreszierenden Bakterien, welche in nicht-kohlenbehandelter Milch gezüchtet sind, geben immer einen größeren Ausschlag als diejenigen, welche in kohlenbehandelter Milch gezüchtet sind, und ebenso wirken die Kulturen von Bact. pyocyaneum stets etwas kräftiger als die Kulturen von Bact.

fluorescens liquefaciens. Bact. pyocyaneum bildet ja auch außer Fluoreszein Pyocyanin, das nach O. Ehrismann ein Atmungsferment ist[1]).

Tabelle 3.

	Nährlösung	Die fur die Kultur verwendete Milch	Bakterienart			
			Tbm. lactis 10		Sbm. casei 11	
	Nichtkohlenbehandelte Milch		7,9	15,8	5,2	11,0
Kohlenbehandelte Milch	Ohne Zusatz		0,2	0,3	0,1	0,2
Kohlenbehandelte Milch, Ohne Bios	+ 2,5% Kultur von Bact. fluor. liquef.	kohlenbehandelt	0,8	0,9	0,9	1,7
Kohlenbehandelte Milch, Ohne Bios	+ 2,5% Kultur von Bact. fluor. liquef.	nichtkohlenbehandelt	1,0	1,4	0,7	1,2
Kohlenbehandelte Milch, Ohne Bios	+ 5 % Kultur von Bact. fluor. liquef.	kohlenbehandelt	0,8	0,8	1,0	1,8
Kohlenbehandelte Milch, Ohne Bios	+ 5 % Kultur von Bact. fluor. liquef. + Laktoflavin (0,5 mg/l)	kohlenbehandelt	0,8	1,1	1,1	2,7
Kohlenbehandelte Milch, Ohne Bios	+ 2,5% Kultur von Bact. pyocyaneum	kohlenbehandelt	1,1	1,9	2,7	4,3
Kohlenbehandelte Milch, Ohne Bios	+ 2,5% Kultur von Bact. pyocyaneum	nichtkohlenbehandelt	1,5	1,9	4,1	7,0
Kohlenbehandelte Milch, Ohne Bios	+ 5 % Kultur von Bact. pyocyaneum	kohlenbehandelt	1,8	2,9	2,9	5,4
Kohlenbehandelte Milch, Ohne Bios	+ 5 % Kultur von Bact. pyocyaneum + Laktoflavin (0,5 mg/l)	kohlenbehandelt	1,8	2,9	3,6	7,9
Kohlenbehandelte Milch	Mit Bios		2,5	5,4	1,6	3,8
Kohlenbehandelte Milch, Mit Bios	+ Laktoflavin (0,5 mg/l)		3,2	8,1	4,7	11,9
Kohlenbehandelte Milch, Mit Bios	+ 2,5% Kultur von Bact. fluor. liquef.	kohlenbehandelt	6,1	12,2	4,5	9,9
Kohlenbehandelte Milch, Mit Bios	+ 2,5% Kultur von Bact. fluor. liquef.	nichtkohlenbehandelt		13,7		14,0
Kohlenbehandelte Milch, Mit Bios	+ 5 % Kultur von Bact. fluor. liquef.	kohlenbehandelt	7,4	15,1	7,9	13,1
Kohlenbehandelte Milch, Mit Bios	+ 2,5% Kultur von Bact. pyocyaneum	kohlenbehandelt	8,1	15,3	6,3	12,2
Kohlenbehandelte Milch, Mit Bios	+ 2,5% Kultur von Bact. pyocyaneum	nichtkohlenbehandelt	9,0	15,5		14,4
Kohlenbehandelte Milch, Mit Bios	+ 5 % Kultur von Bact. pyocyaneum	kohlenbehandelt	8,6	16,0	8,1	15,3
	Titriert nach Anzahl Stunden		24	92	67	140

Zusammenfassung.

1. Nicht nur die echten Milchsäurebakterien der Milch, sondern sämtliche echte Milchsäurebakterien benötigen Bios und Laktoflavin. Auch die Propionsäurebakterien und die Tetrakokken bilden mehr Säure in nichtkohlenbehandelter als in kohlenbehandelter Milch. Die farbstoffbildenden Tetrakokken bilden überhaupt keinen Farbstoff in letzterer. Sarcina flava dagegen wächst und bildet Farbstoff gleich gut in Milch, einerlei ob dieselbe kohlenbehandelt ist oder nicht.

2. Im Gegensatz zu den echten Milchsäurebakterien gedeihen die unechten Milchsäurebakterien — die Coli- und Aërogenesbakterien — gleich gut in kohlenbehandelter und in nicht-kohlenbehandelter Milch, was damit übereinstimmt, daß diese Bakterien sich in rein synthetischen Nährlösungen entwickeln können; in ähnlicher Weise verhält sich Microbacterium lacticum. Die Heu- und Kartoffelbazillen scheinen sogar besser in kohlenbehandelter als in nicht-kohlenbehandelter Milch zu wachsen.

3. Die fluoreszierenden Bakterien und Bacterium prodigiosum wachsen schneller in nicht-kohlenbehandelter als in kohlenbehandelter Milch. Die fluoreszierenden Bakterien bilden auch mehr Farbstoff in der

[1]) Pyocyanin und Bakterienatmung. (Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. 116. 1934. S. 209.)

ersteren, während das umgekehrte mit Bacterium prodigiosum der Fall ist.

4. Es wird bewiesen, daß das Bakteriofluoreszein ein Flavin ist, und daß das Prodigiosin für Bact. prodigiosum eine biosähnliche Rolle spielt.

Während des Drucklegens dieser Arbeit ist es uns gelungen zu zeigen, daß Bacterium violaceum sich bezüglich der Farbstoffbildung genau wie Bacterium prodigiosum verhält. Das violette Bakterienpigment, das Janthin, muß deshalb auch eine biosähnliche Rolle spielen. Wir kommen in einer besonderen Arbeit auf diese Frage zurück.

Über Wuchsstoffe in den Peptonen.

[Aus dem biotechnisch-chemischen Laboratorium der dänischen technischen Hochschule, Vorstand Professor Dr. S. Orla-Jensen.]

Von **S. Orla-Jensen, N. C. Otte** und **Agnete Snog-Kjær.**

Peptonlösungen mit den notwendigen Nährsalzen gehören bekanntlich zu den häufigst benutzten Nährlösungen der Bakterien. Nachdem wir in der Arbeit über den Vitaminbedarf der Milchsäurebakterien gezeigt haben, daß diese Bakterien zu ihrem Wachstum Milchbios und Laktoflavin bedürfen, ist man berechtigt zu schließen, daß in den Peptonlösungen, in welchen die Milchsäurebakterien gedeihen können, auch wenigstens geringe Mengen der genannten Aktivatoren vorhanden sein müssen. Es ist von vornherein zu erwarten, daß dies bei Kaseinpepton der Fall ist, und demgemäß haben wir gefunden, daß Kaseinpepton, aus gewöhnlichem Säurekasein hergestellt, ein besonders gutes Nährsubstrat für die Milchsäurebakterien ist. Weniger geeignet ist Wittepepton, und noch schlechter ist Kaseinpepton, wenn es von mehrfach gereinigtem Kasein (nach Hammarsten) hergestellt wird. Wir wollen untersuchen, ob Pepton von Hammarstens Kasein (CH) durch Zusatz von Milchbios oder Laktoflavin ebenso geeignet wie gewöhnliches Kaseinpepton (C) werden kann. Da, wie Jones und Gersdorff gezeigt haben[1]), bei der Herstellung von Kasein nach Hammarsten durch das wiederholte Auflösen in Alkali ein Teil des Cysteins zerstört wird, ist anzunehmen, daß man, um CH mit C gleichwertig zu machen, dem ersteren noch ein wenig Cystein zusetzen muß. Der Stickstoffgehalt unserer Peptonlösungen ist auf 0,5% eingestellt.

Aus der Tabelle 1 geht deutlich hervor, daß die Milchsäurebakterien der Milch weit schlechter in CH als in C gedeihen. Ein Zusatz von Cystein hat nur bei dem besonders cysteinbedürftigen Sbm. casei genutzt. Laktoflavin allein gibt einen geringen Ausschlag bei Tbm. bulgaricum und Tbm. helveticum. Ein Zusatz von Bios macht dagegen CH zu einem ebenso guten oder noch besseren Nährboden für die Milchsäurebakterien als C. Eine Ausnahme bildet jedoch Tbm. helveticum, das in diesem Versuch überhaupt (auch in C) schlecht gewachsen ist. Von Tbm. bulgaricum abgesehen gedeihen die Thermobakterien etwas besser mit

[1]) Journ. of Biological Chemistry. Vol. 104. 1934. p. 99.

Cystein + Bios als mit Bios allein. Mit Laktoflavin + Bios bilden sämtliche Milchsäurebakterien und besonders Tbm. bulgaricum etwas mehr Säure als mit Bios allein. Mit allen drei Zusätzen bekommt man bei Tbm. lactis 9 und 10 und besonders bei Tbm. helveticum noch eine weitere Säuresteigerung.

Tabelle 1.

Nährlösung	Bakterienart													
	Tbm. lactis 9		Tbm. lactis 10		Tbm. bulgaricum		Tbm. helveticum		Sbm. casei 11		Sc. cremoris 18		Sc. lactis 22	
C ohne Zusatz	6,8	9,2	1,6	6,5	5,2	6,8	1,8	1,8	0,2	0,3	2,5	3,4	3,2	4,1
CH ohne Zusatz	0,3	0,3	0,2	0,3	1,1	1,1	0,2	0,2	0,1	0,2	0,8	1,8	1,1	2,5
CH mit Cysteïn	0,3	0,3	0,1	0,2	0,5	0,5	0,3	0,3	3,2	3,8	0,8	1,8	1,0	2,0
CH mit Laktoflavin	0,3	0,3	0,1	0,2	0,9	0,9	0,6	0,6	0,1	0,1	0,7	1,7	1,1	2,0
CH mit Bios	8,3	9,0	3,6	5,9	8,6	9,7	0,6	0,6	3,8	5,2	3,2	4,3	3,4	3,8
CH mit Cysteïn. + Bios	10,6	11,3	6,5	8,6	7,9	8,6	0,7	0,7	2,7	5,2	3,2	3,8	1,6	2,5
CH mit Laktoflavin + Bios	9,7	11,0	5,5	7,4	9,9	12,8	0,6	0,9	3,8	5,6	3,8	4,5	3,8	4,7
CH mit Cysteïn + Laktoflavin + Bios	12,4	14,2	7,7	10,4	10,1	11,0	3,8	3,8	4,7	5,6	2,7	4,1	2,7	3,8
Titriert nach Anzahl Stunden	70	119	70	145	70	119	70	119	119	145	24	119	24	119

Aus diesen Versuchen kann man schließen, daß die geprüften Milchsäurebakterien mit den Mengen von Cystein und Laktoflavin, die in CH vorhanden sind noch gut gedeihen. Was hier fehlt ist besonders das durch die Reinigung entfernte Milchbios. Wenn dieser Aktivator dem CH in der Menge, wie er in normaler Milch vorkommt, zugesetzt wird, wird CH dem C gleichwertig oder sogar noch überlegen. Der Gehalt des C's an Aktivatoren ist ja keineswegs konstant, sondern hängt davon ab, wie das verwendete Kasein behandelt, besonders gewaschen worden ist. Jedenfalls wird Kaseinpepton auch wenn es ebenso viel Stickstoff wie Milch (0,5%) enthält stets ärmer an Aktivatoren als Milch sein. Für die Milchsäurebakterien, die typische Milchbakterien sind, ist Milch oder peptonisierte Milch[1]) stets ein besserer Nährboden als Kaseinpepton. Die Thermobakterien der Milch können auf die Dauer überhaupt nur in Milch gezüchtet werden, sie sterben schnell ab, wenn man sie wiederholt von Peptonbouillon zu Peptonbouillon weiterzuimpfen versucht.

Für unsere bakteriologischen Untersuchungen verwenden wir bisweilen Kaseinpepton mit dem doppelten Stickstoffgehalt der Milch (1%), weil solches (2 C) für die Milchsäurebakterien ein besserer Nährboden als C ist. Nicht nur, daß sie mehr Säure darin bilden, was man lediglich der größeren Pufferwirkung zuschreiben könnte, sonderen sie vermögen häufig mehr Zuckerarten in 2 C als in C zu vergären[2]), und dies kann nur daher rühren,

[1]) Orla-Jensen, S., Der beste Nährboden der Milchsäurebakterien. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 4. 1898. S. 196.)

[2]) Orla-Jensen, S., Orla-Jensen, Anna D., und Winther, O., Bacterium bifidum und Thermobacterium intestinale. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 93. 1936. S. 321—343.)

daß 2 C die Milchsäurebakterien stärker aktiviert als C. Es ist das nicht verwunderlich, wenn man bedenkt, daß 2 C doppelt so reich an Aktivatoren als C sein muß, sofern es vom selben Kasein hergestellt worden ist. Wir wollen untersuchen, ob es möglich ist, durch Zusatz von Laktoflavin und Bios zu C die Säurebildung der Milchsäurebakterien darin zu steigern. Von diesen Aktivatoren haben wir im folgenden Versuche (Tabelle 2) die in der normalen Milch vorkommenden Mengen dem C zugesetzt. Außerdem haben wir die Wirkung eines Zusatzes von so viel Pepsin untersucht, daß der Gehalt an Pepsin in C ebenso noch als in 2 C ist.

Tabelle 2.

Nährlosung	Bakterienart													
	Tbm. lactis 9		Tbm. lactis 10		Tbm. bulgaricum		Tbm. helveticum		Sbm. casei 11		Sc. cremoris 18		Sc. lactis 22	
C ohne Zusatz .	2,9	10,6	3,6	6,8	1,4	8,3	2,0	2,9	2,3	5,4	3,2	4,3	3,8	5,2
C mit Pepsin .	6,3	12,4	6,1	9,5	1,6	5,6	2,5	2,9	4,5	6,5	3,2	4,3	3,8	5,0
C mit Laktoflavin	2,9	10,6	3,8	7,4	1,4	4,7	2,3	3,2	2,5	4,3	3,2	4,3	3,8	5,0
C mit Bios . .	5,2	10,8	8,3	11,0	5,6	11,9	2,7	4,3	6,1	7,7'	3,6	4,5	3,6	4,5
C mit Laktoflavin + Bios	5,9	13,1	9,2	11,0	4,7	12,2	3,2	6,3	6,8	8,6	4,1	4,7	3,8	4,5
2 C ohne Zusatz	8,6	16,2	8,6	12,8	1,4	9,0	3,4	5,9	8,3	10,6	5,9	7,0	5,9	8,1
Milch ohne Zusatz	10,1	18,7	10,1	13,3	11,5	16,4	11,3	22,3	10,8	12,6	3,2	6,3	4,7	6,8
Titriert nach Anzahl Stunden .	25	95	52	95	25	95	25	95	113	139	25	95	25	95

Aus der Tabelle 2 geht hervor, daß wie in den vorigen Versuchen mit CH es auch bei C meistens Bios ist, das die günstigste Wirkung ausübt. Laktoflavin allein ist ohne Wirkung, mit Bios zusammen verbessert es dagegen C so stark, daß die Milchsäurestäbchen fast ebenso viel oder sogar mehr Säure in C als in 2 C bilden können. Es ist somit bewiesen, daß der Grund, weshalb diese Stäbchen besser in 2 C als in C gedeihen, weniger eine Ernährungs- und Pufferfrage als eine Aktivatorfrage ist. Es ist zu bemerken, daß Milch, trotzdem sie nur halb so viel Stickstoff wie 2 C enthält, dennoch stets ein besseres Nährsubstrat für die stäbchenförmigen Milchsäurebakterien darstellt, weil sie reicher an Aktivatoren ist. Die Streptokokken verhalten sich in allen letztgenannten Beziehungen umgekehrt wie die Stäbchen. Hinsichtlich der Streptokokken zeigt sich C durch den Aktivatorzusatz gar nicht verbessert. Wenn hier 2 C besser wirkt als C, ja sogar besser als Milch, so rührt das hauptsächlich von der starken Pufferwirkung des 2 C's her, denn die Streptokokken können nicht viel Säure vertragen. Sie vertragen indessen auch nicht viel Laktationen, und die Wasserstoffionenkonzentration (nach 10 Tagen bei 30° C) war deshalb etwas kleiner in 2 C als in C, also das Gegenteil von dem, was die titrimetrische Säuremenge zeigt.

Ähnliche Versuche wie die mit Kaseïnpepton haben wir auch mit Wittepepton angestellt, und die Ergebnisse waren ganz die gleichen. Durch Zusatz von Laktoflavin wurde Wittepepton als Nährsubstrat nicht verbessert weder für die Milchsäurestäbchen noch für die Streptokokken. Durch Zusatz von Bios wird Wittepepton dagegen ein viel besseres Nährsubstrat für die Stäbchen, während dieser Zusatz keinen Einfluß auf das Gedeihen der Streptokokken hat. Daraus ist zu schließen, daß die Peptone schon Laktoflavin sogar in einer zur Aktivierung der Milchsäurestäbchen genügenden Menge

enthalten, während sie von Bios nur genügend für die Streptokokken, aber nicht genügend für die Stäbchen enthalten. Der geringe Biosgehalt der Peptone kann, wie wir es bezüglich des Kaseinpeptons gezeigt haben, dem verwendeten Eiweißkörper angehaftet haben. Für die relativ größere Laktoflavinmenge muß man dagegen eine für alle Peptone gemeinsame Quelle, nämlich das benutzte proteolytische Enzym annehmen. Daß wir hier auf dem richtigen Wege sind, geht aus der Tabelle 2 hervor. Durch Zusatz von Pepsin zu Kaseinpepton wird dieses Substrat gegenüber Tbm. lactis 9 und 10 und gegenüber Sbm. casei verbessert. Für das erstere Bakterium ist die Aktivierung fast ebenso kräftig, wie man sie durch Zusatz von Laktoflavin + Bios erhält.

In der Arbeit über den Vitaminbedarf der Milchsäurebakterien wurde gezeigt, daß man in mit aktiven Kohlen behandelter Milch, welcher wieder das entfernte Milchbios zugesetzt wird, ein vorzügliches Mittel zum Nachweis von Laktoflavin hat. Wir wollen dieses Mittel gegenüber folgenden Enzympräparaten untersuchen: Das Pepsin, welches wir stets zur Herstellung von Kaseinpepton verwenden (Pepsin 1 : 900), ein reineres Pepsinpräparat (Pepsin 1 : 10 000); ein Pankreatin, das wir zur Herstellung von tryptophanhaltigen Nährsubstraten zum Nachweis von Indol verwenden; ein unreines und ein sehr reines Papainpräparat, ferner Lablösungen und Labtabletten.

Die proteolytischen und koagulierenden Eigenschaften dieser Enzyme waren vor dem Zusatz durch Erwärmung der wässerigen Lösung vernichtet worden. Alle Präparate wurden in der Menge von 1% kochsalzfreier Trockensubstanz verwendet, die Labpräparate außerdem in der geringen Menge (k), wie sie in der Käsefabrikation üblich sind. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in der Tabelle 3 zusammengestellt.

Tabelle 3.

Nahrlosung	Bakterienart									
	Tbm. lactis 9		Tbm. lactis 10		Tbm. bulgaricum		Tbm. helveticum		Sbm. casei 11	
Nichtkohlenbehandelte Milch	9,7	18,5	10,1	14,4	10,1	16,2	9,9	22,7	3,2	5,4
Kohlenbehandelte Milch: Ohne Zusatz	0	0,5	0	0,1	0,2	0,6	0	0,5	0,2	0,7
Kohlenbehandelte Milch: Mit Bios	4,5	9,9	0,7	0,8	2,3	7,2	1,8	7,2	1,1	2,7
Kohlenbehandelte Milch, Mit Bios: u. Laktoflavin (0,5 mg/l)	6,3	14,6	6,3	11,5	9,0	15,8	3,6	16,2	4,1	11,7
u. unreinem Pepsin (1‰)	8,8	13,3	8,3	11,0	7,7	12,6	7,4	16,0	6,3	11,7
u. reinem Pepsin (1‰)	8,8	12,8	0,6	5,0	7,4	9,7	1,6	10,6	5,0	8,8
u. Pankreatin (1‰)	8,1	13,5	6,1	9,9	2,2	10,8	1,6	10,6	8,6	12,2
u. unreinem Papaïn (1‰)	6,5	9,3	7,0	8,6	6,8	9,7	5,0	9,9	6,1	10,4
u. reinem Papaïn (1‰)	7,2	9,7	3,2	4,3	8,1	9,7	3,8	11,5	4,5	6,3
u. Lablosung (1‰)	5,4	14,9	10,4	12,8	3,8	8,6	4,1	12,2	6,3	13,7
u. Lablosung k	4,7	10,1	0,9	2,3	3,6	6,1	2,0	10,6	3,2	5,0
u. Labtablette (1‰)	4,3	9,5	9,9	11,7	3,6	6,8	3,2	9,0	6,1	9,9
u. Labtablette k	3,2	10,1	0,9	2,0	3,4	5,4	2,7	11,3	1,8	3,2
Titriert nach Anzahl Stunden	24	92	46	92	24	92	24	92	68	141

Diese Tabelle zeigt sehr deutlich, daß sämtliche geprüften proteolytischen Enzyme, sie mögen, wie die Mehrzahl derselben, animalischen Ursprunges oder wie das Papain vegetabilischen Ursprunges sein, verhältnismäßig reich an Laktoflavin sind, weil 100 mg derselben meistens die gleiche

Wirkung ausüben wie 0,5 mg reines Laktoflavin. Mit geringeren Mengen der Enzympräparate wurde die Wirkung selbstverständlich entsprechend schwächer. Wie früher hervorgehoben, eignen sich Tbm. lactis 10 und Sbm. casei 11 am besten zum Nachweis von Laktoflavin, weil sie so viel von diesem Aktivator beanspruchen, daß sie auf die kleine Menge Laktoflavin, die in unserem Biospräparat vorhanden ist, nur sehr wenig reagieren[1]). Die zuverlässigsten Zahlen bekommen wir deshalb mit diesen zwei Bakterien. Aus der Tabelle 3 ersieht man ferner, daß das unreine Pepsin und Papain stärker als die entsprechenden reineren Präparate reagieren, und man muß daher annehmen, daß das Laktoflavin nicht ein wesentlicher Bestandteil, sondern nur eine Verunreinigung dieser Enzyme ist. Mit dem Laktoflavin, das in der geringen in der Käsefabrikation üblichen Labmenge vorhanden ist, werden die Milchsäurebakterien zu wenig aktiviert (man vergleiche Bios + k mit Bios allein), um in der Entwicklung der die Käsereifung hervorrufenden Milchsäurestäbchen eine nennenswerte Rolle zu spielen. Warum die proteolytischen Enzyme so viel Laktoflavin enthalten, ist schwer zu verstehen, denn dieses Vitamin wirkt, wie in der vorigen Arbeit gezeigt, auf die Proteolyse schwach hemmend.

Da, wie wir soeben gezeigt haben, die kohlenbehandelte Milch durch den Zusatz von $1^0/_{00}$ der geprüften proteolytischen Enzyme wieder ihren natürlichen Laktoflavingehalt erhält, gibt uns dieser Zusatz, wohl bemerkt ohne den gleichzeitigen Zusatz von Bios, ein Maß für den Biosgehalt dieser Enzyme. Wir haben dies mit dem Pepsin und dem Pankreatin untersucht. Zum Vergleich haben wir auch die gleiche Stickstoffmenge in Form von (2%) Hefeautolysat geprüft. Ferner haben wir die Wirkung dieser Zusätze auf die gleiche Milch ohne Kohlenbehandlung geprüft. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 4 zusammengestellt.

Tabelle 4.

Milch		Bakterienart								
		Tbm. intestinale 314	Tbm. lactis 10	Tbm. bulgaricum	Tbm. helveticum	Sbm. casei 11	Sc. thermophilus 7	Sc. cremoris 215	Sc. lactis 22	Sc. lactis 33
Kohlenbehandelt	Ohne Zusatz	0,5	0,9	2,0	0,8	0,5	2,6	2,7	2,7	2,9
	Mit unreinem Pepsin	5,9	0,9	2,3	1,7	6,2	5,2	5,3	5,0	5,0
	Mit reinem Pepsin . .	6,1	1,1	2,1	2,1	2,7	4,3	4,1	4,3	3,8
	Mit Pankreatin . . .	9,9	7,7	6,3	7,9	5,4	5,4	6,3	6,3	5,9
	Mit Hefeautolysat . .	7,4	7,0	7,2	8,1	5,6	5,6	6,1	6,8	5,4
Nicht kohlenbehandelt	Ohne Zusatz	3,6	10,1	16,8	17,6	7,8	6,0	5,7	7,1	6,8
	Mit unreinem Pepsin	11,4	14,0	18,0	21,6	11,1	7,1	7,5	7,5	7,7
	Mit reinem Pepsin . .	11,9	13,6	18,3	21,2	10,9	7,2	7,2	7,3	7,2
	Mit Pankreatin . . .	12,6	15,8	18,2	21,4	12,6	6,8	7,4	8,3	7,7
	Mit Hefeautolysat . .	11,0	11,9	17,8	21,6	9,7	7,0	7,2	7,4	7,2
Titriert nach Anzahl Std.:		96	48	96	48	100	48	70	100	144

[1]) Der Vitaminbedarf der Milchsäurebakterien (Tab. 5). Auch die anderen Milchsäurestäbchen sind zu verwenden, wenn wir das Bios durch Erwärmen mit Alkali von Laktoflavin befreien.

In obiger Tabelle ist neben unseren gewöhnlichen Milchsäurebakterien noch ein Darmmilchsäurebakterium, Thermobacterium intestinale (Bacillus acidophilus) verwendet worden. Wir wollen dasselbe vorläufig außer Betracht lassen. Ferner lassen wir auch vorläufig die nicht-kohlenbehandelte Milch außer acht. Es ist bekannt, daß Hefeautolysat sowohl Bios wie Laktoflavin enthält, und demgemäß steigt die Säureproduktion unserer Bakterien auch beträchtlich, wenn der kohlenbehandelten Milch 2% Hefeautolysat zugesetzt wird. Eine ähnliche Säuresteigerung erhält man mit 1‰ Pankreatin, was beweist, daß dieses Enzympräparat außer Laktoflavin noch eine ansehnliche Menge Bios enthalten muß. Was die Pepsinpräparate anbetrifft, so ist die Wirkung derselben äußerst schwach gegenüber den Thermobakterien, dagegen nicht unbeträchtlich gegenüber den übrigen Milchsäurebakterien, und auch hier gibt das weniger reine Pepsin eine kräftigere Säuresteigerung als das reinere Pepsin. Dies zeigt sich am deutlichsten bei Sbm. casei, dessen Ansprüche an Bios offenbar geringer sind als an Laktoflavin. Wie Pankreatin enthalten unsere Pepsinpräparate somit außer einer relativ großen Menge Laktoflavin auch noch Bios. Die Menge des letzteren in den Pepsinpräparaten ist jedoch (wenn nur 1‰ derselben der kohlenbehandelten Milch zugesetzt wird) nicht groß genug, um den starken Biosbedarf der Thermobakterien befriedigen zu können.

Hiermit ist indessen die Frage über die aktivierende Wirkung der proteolytischen Enzyme noch nicht erschöpft. Diese Enzyme und ganz besonders das Pankreatin enthalten wie Hefeautolysat noch andere Aktivatoren als Bios und Laktoflavin, denn sie regen auch in Milch, welche nicht durch Kohlenbehandlung dieser zwei Stoffe beraubt ist, die Milchsäurebakterien zu erhöhter Säureproduktion an. Aus der Tabelle 4 ersieht man, daß dies ganz besonders der Fall ist bei Tbm. intestinale. Da wir die Aktivierung der Darmbakterien durch Verdauungssekrete an anderer Stelle eingehend behandelt haben[1]), wollen wir hier nicht näher darauf eingehen.

Nach dem Erfolg, den wir bei Behandlung der Milch mit aktiven Kohlen erreicht hatten, lag es nahe zu untersuchen, ob sich Peptonlösungen nicht auch auf diese Weise inaktivieren ließen, zumal die Kohlen viel leichter von solchen Lösungen zu trennen sind, da man sie hier einfach abfiltrieren kann, so daß man das kräftige Zentrifugieren nicht nötig hat. Leider adsorbieren die aktiven Kohlen außer Vitaminen der B-Gruppe noch manche höheren Eiweißzersetzungsprodukte, weshalb sie auch in der Eiweißchemie ebenso wie Metallsalze, Gerbsäure, Phosphorwolframsäure usw. zur Differenzierung der bei der Proteolyse gebildeten Stoffe benutzt werden. Während Milch mit etwas über 0,5% N durch die zweifache Behandlung mit Kohlen höchstens 0,04% N verliert, wovon noch ein wesentlicher Teil (Leukozyten, Mikroorganismen usw.) der scharfen Zentrifugierung zuzuschreiben ist, verliert eine Wittepeptonlösung von 0,51% N bei der Kohlenbehandlung 0,29% N. Wenn deshalb die Milchsäurebakterien in der kohlenbehandelten Wittepeptonlösung schlechter als in der nicht kohlenbehandelten Lösung gedeihen, so rührt das ebenso sehr vom Verlust an Nährstoffen wie vom Verlust an Aktivatoren her. Bei dem von uns hergestellten Hefeautolysat sind

[1]) Orla-Jensen, S., Orla-Jensen, Anna D. und Winther, O., Bacterium bifidum und Thermobacterium intestinale. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 93. 1936. S. 321—343.)

die Verhältnisse kaum so ungünstig, weil hier die Proteolyse viel weiter vorgeschritten ist als im Wittepepton. So verlor ein Hefeautolysat mit 0,7% N bei der zweifachen Kohlenbehandlung, wodurch es vollständig entfärbt wurde, nur 0,15% N. Wir wollen deshalb die Ergebnisse eines Versuches mit Hefeautolysat hier erwähnen. Da das konzentrierte Eluat von den Kohlen 4,5% N enthielt, wurde der Stickstoffgehalt des Autolysates durch Zusatz von nur 1% desselben um 0,05% N vermehrt. Um diesen Fehler zu korrigieren, haben wir das Autolysat, dem Eluat zugesetzt wurde, vorher mit so viel Wasser verdünnt, daß wir stets denselben Stickstoffgehalt hatten.

In der Tabelle 5 sind die Resultate der Versuche mit Hefeautolysat zusammengestellt. Der Stickstoffgehalt war überall 0,5% und der Zuckergehalt 2%. Das Eluat wurde sowohl ohne Alkalibehandlung wie nach einer solchen verwendet[1]). Außer unseren gewöhnlichen Milchsäurebakterien haben wir noch einige Arten, wie Thermobacterium cereale, Betabakterien und Betakokken, die besser in Hefeautolysat als in Milch gedeihen, geprüft.

Tabelle 5 a.

Hefeautolysat	% Eluat zugesetzt	Eluat alkalibehandelt	Bakterienart											
			Tbm. cereale 4		Tbm. lactis 9		Tbm. lactis 10		Tbm. bulgaricum		Tbm. helveticum		Tbm. Jugurt	
Nichtkohlenbehandelt	0		9,9	14,0	2,9	8,6	3,6	4,7	0,7	3,4	8,3	9,2	10,1	11,7
Kohlenbehandelt	0		1,6	2,5	0,9	6,1	1,8	3,4	0,2	1,4	7,7	7,9	0,9	2,7
,,	1	nein	3,8	6,1	2,5	7,7	3,6	7,4	5,6	6,5	9,2	11,0	5,6	9,0
,,	1	ja	3,2	4,5	1,4	3,8	1,1	5,2	8,1	9,2	8,3	10,1	1,8	5,9
,,	2	nein	2,7	7,7	5,0	10,4	4,3	7,9	3,2	3,2	9,5	11,3	5,0	6,5
,,	2	ja	1,6	5,0	0,9	4,3	2,3	5,0	8,6	9,0	8,6	9,7	1,1	5,9
Titriert nach Anzahl Std.			48	100	18	95	66	118	66	95	66	95	48	100

Tabelle

Hefeautolysat	% Eluat zugesetzt	Eluat alkalibehandelt	Bakterienart											
			Sbm. casei 11		Bbm. brevo 10		Sc. cremoris 18		Sc. lactis 22		Bc. arabinosaceus 12		Bc. cremoris 6	
Nichtkohlenbehandelt	0		5,0	9,9	5,0	9,2	2,3	2,5	4,7	4,7	9,7	9,7	3,2	2,9
Kohlenbehandelt	0		1,8	5,6	1,1	5,2	2,0	3,8	3,2	4,1	9,2	8,8	0,9	0,9
,,	1	nein	4,5	7,0	3,6	7,7	3,2	3,8	3,6	3,8	10,6	10,6	2,9	2,9
,,	1	ja	3,6	5,6	1,8	7,7	3,2	4,1	2,5	2,3	13,1	10,6	1,8	1,8
,,	2	nein	3,8	6,5	3,4	7,9	2,7	3,6	3,2	3,8	11,3	9,0	4,3	3,4
,,	2	ja	3,2	5,9	2,5	8,1	3,6	5,0	1,8	3,4	9,9	8,6	0,2	0,5
Titriert nach Anzahl Std.			66	118	66	118	66	95	66	95	66	95	66	95

[1]) Über die Herstellung und Alkalibehandlung der Eluate müssen wir auf die Arbeit „Der Vitaminbedarf der Milchsäurebakterien" verweisen. Hier soll nur erwähnt werden, daß die Kohlenbehandlung des Hefeautolysats beim $p_H = 6$ stattfand, und daß das Eluiren mit Pyridin + Methylalkohol + Wasser vorgenommen wurde. Die Alkalibehandlung geschah, um das alkalifeste Bios vom alkaliempfindlichen Laktoflavin zu trennen.

Die Tabellen 5 a und 5 b zeigen, daß der Versuch Hefeautolysat mittels aktiver Kohlen zu inaktivieren bei den geprüften Bakterien verschieden ausfällt. Am besten gelang die Inaktivierung bei dem Maischebakterium Thermobacterium cereale (Bacillus Delbrückii) und dem Butteraromabakterium Betacoccus cremoris, welche als Reinkultur in Milch schlecht, ausgezeichnet dagegen in Hefeautolysat wachsen. Ferner gelang die Inaktivierung bei den zwei Yoghurtstäbchen, Tbm. bulgaricum und Tbm. Jugurt. Wenig gut gelang die Inaktivierung bei dem Reifungsbakterium des Emmentalerkäses, Tbm. helveticum, bei den zwei Sauermilchstreptokokken, Sc. cremoris und Sc. lactis, und ganz besonders schlecht bei dem Froschlaichbakterium Bc. arabinosaceus. In den Fällen, in denen die Inaktivierung gelingt, wird auch ein Zusatz von Eluat mehr oder weniger günstig wirken. Sonderbarerweise scheint der Zusatz von 2% Eluat nicht immer besser zu wirken als 1% desselben. Bei den Yoghurtstäbchen und bei Sc. cremoris 18 ist die Säurebildung geringer mit 2% als mit 1% Eluat, woraus zu schließen ist, daß das Eluat außer aktivierenden Bestandteilen noch Hemmungsstoffe enthält.

Die Alkalibehandlung des Eluates, wodurch die Hauptmenge des darin vorhandenen Laktoflavins zerstört wird, muß natürlicherweise die aktivierende Wirkung abschwächen. Wenn nichtsdestoweniger wie bei Tbm. bulgaricum und Sc. cremoris das umgekehrte der Fall sein kann, ist die einzige Erklärung die, daß die obenerwähnten Hemmungsstoffe auch durch die Alkalibehandlung zerstört werden. Wir haben früher ähnliche Verhältnisse mit Hefepräparaten beobachtet[1]). Es mag noch erwähnt sein, daß bei Bc. arabinosaceus und (nur in zwei Fällen) bei Bc. cremoris die zweite Titrierung niedrigere Säurezahlen gibt als die erste. Dies rührt daher, daß die Betakokken wie die Aerogenesbakterien einen Teil der gebildeten Milchsäure wieder als Energiequelle verwenden.

Zusammenfassung.

1. Die in der Bakteriologie benutzten Peptone enthalten eine selbst für die normale Entwicklung der Milchsäurestäbchen genügende Menge Laktoflavin. Ihr Gehalt an Bios reicht dagegen meistens hierfür nicht aus, ist aber für die Streptokokken genügend.

2. Die günstige Wirkung, die man durch Erhöhung der Konzentration der Peptonlösungen erzielt, rührt bezüglich der Milchsäurestäbchen hauptsächlich vom erhöhten Gehalt an den Aktivatoren, und bezüglich der Streptokokken hauptsächlich von der erhöhten Pufferwirkung her.

3. Die im Handel befindlichen Präparate von proteolytischen Enzymen sind sehr reich an Laktoflavin. Sie enthalten außerdem Bios und noch andere Aktivatoren, die besonders die Entwicklung der Milchsäurestäbchen des Darmes begünstigen.

4. Das in den Peptonen vorkommende Laktoflavin rührt hauptsächlich von dem zu ihrer Herstellung benutzten Enzympräparat her, während das in den Peptonen vorkommende Bios auch vom verwendeten Eiweißkörper herrühren kann, wie dies beim gewöhnlichen Kaseinpepton der Fall ist.

5. Die Inaktivierung von Peptonlösungen mittels aktiver Kohlen ist nicht so einfach wie die Inaktivierung der Milch, weil außer den Aktivatoren noch große Mengen der Peptone von den Kohlen adsorbiert werden. Ein Versuch mit Hefeautolysat zeigte indessen ähnliche Verhältnisse wie bei der Milch.

[1]) Der Vitaminbedarf der Milchsäurebakterien (Tab. 4).

Die Stickstoffnahrung der Milchsäurebakterien.

[Aus dem biotechnisch-chemischen Laboratorium der dänischen technischen Hochschule, Vorstand Professor Dr. S. Orla-Jensen.]

Von S. Orla-Jensen, N. C. Otte und Agnete Snog-Kjær.

Wie in früheren Arbeiten hervorgehoben wurde, stellen die echten Milchsäurebakterien — Streptokokken wie Stäbchen — scheinbar sehr große Ansprüche an ihre Stickstoffnahrung[1]). Je nach ihrer Art beanspruchen sie Milch, Maische oder zuckerhaltige Bouillon. Für sehr viele Milchsäurebakterien ist Kaseinpepton oder Hefeautolysat und zwar in recht hohen Konzentrationen eine besonders geeignete Stickstoffquelle. Bis jetzt ist es noch nie gelungen, die echten Milchsäurebakterien mit Aminosäuren, geschweige denn mit Ammoniaksalzen als einziger Stickstoffquelle zum Wachstum zu bringen. Hierüber kann man sich nicht mehr wundern, nachdem wir gezeigt haben, daß die Milchsäurebakterien zu ihrer Entwicklung wenigstens zweier Aktivatoren bedürfen. Die Frage ist nun, ob sich die Milchsäurebakterien mit einfacherer Stickstoffnahrung begnügen können, wenn die nötigen Aktivatoren zur Verfügung stehen.

Da die Herstellung von Milchbios mit viel Mühe verbunden ist, und da wir gezwungen waren, mit dem von Prof. R. Kuhn uns gütigst überlassenen Laktoflavin hauszuhalten, versuchten wir zur ersten Orientierung einen Weg einzuschlagen, bei dem wir zur Lösung der zu prüfenden stickstoffhaltigen Stoffe Molke verwendeten. Die Molke enthält nämlich die wasserlöslichen Vitamine der Milch, also die für die Milchsäurebakterien nötigen Aktivatoren, ist aber andererseits eine sehr schlechte Stickstoffquelle der genannten Bakterien, was bereits aus dem letzten Teil der Tabelle 3 in unserer Arbeit über den Vitaminbedarf der Milchsäurebakterien hervorgeht. Nur Tbm. bulgaricum und Sc. lactis haben in der dort verwendeten Molke nennenswerte Säuremengen gebildet. Diese Molke war Säuremolke, in welcher das Albumin durch Erwärmung in der Nähe des isoelektrischen Punktes ausgefällt worden war. Wird solche Molke neutralisiert und sterilisiert, dann entsteht noch eine Eiweißfällung, und der Stickstoffgehalt des Filtrates ist auf 0,05% heruntergebracht. Die restierenden stickstoffhaltigen Stoffe bestehen zum größten Teil aus einfachen Verbindungen wie Kreatin, Kreatinin, Harnstoff und Ammoniak, nur 0,02% N ist in Form von komplizierteren Verbindungen vorhanden, die sich nur durch spezifische Eiweißfällungsmittel, deren Verwendung hier ausgeschlossen ist, ausfällen lassen. Da man den Wert besonders von diesen letzteren Verbindungen für die Milchsäurebakterien nicht kennt, können die Molkenversuche nur aufklären, welche stickstoffhaltigen Stoffe unentbehrlich und nicht welche entbehrlich sind, weil wir nicht wissen, ob diese bereits in genügender Menge in der Molke vorkommen. Man entgeht deshalb nicht ergänzenden Versuchen mit rein synthetischen Lösungen.

Was die Mineralstoffe betrifft, so enthält die Molke wie die Milch alles was zum Leben der Bakterien notwendig ist, es fehlt sogar nicht eine Spur von Cu und Zn, und die Phosphorsäuremengen sind relativ groß, selbst-

[1]) Orla-Jensen, S., The Lactic Acid Bacteria. (Det kgl. danske Videnskabernes Selskabs Skrifter. 1919.)

verständlich größer in der Säuremolke als in der Labmolke oder im Chlorkalziumserum. Während das Wachstum der Milchsäurebakterien durch Zusatz von Fe zur Milch nicht gefördert wird, ist in der Molke eine schwache Andeutung in dieser Richtung zu beobachten. Das Optimum liegt jedoch schon bei einem Zusatz von 0,01 $^0/_{00}$ $FeCl_3$. Wir haben deshalb stets diesen Zusatz in unseren Versuchen mit Molke wie mit rein synthetischen Lösungen benutzt.

Aus der Tabelle 1 dieser Arbeit ersieht man, daß Säuremolke, in der genannten Weise von Eiweiß befreit, ein sehr schlechter Nährboden für die Milchsäurebakterien ist, denn sie bilden darin nur wenig Säure. Wie in unseren übrigen Arbeiten drücken die Zahlen der Tabellen die Säuremenge in $^0/_{00}$ Milchsäure aus. Etwas mehr Säure wird in Labmolke gebildet, weil dieselbe, in der gleichen Weise behandelt, fast die doppelte Menge Stickstoff enthält. Da Molke dieselben löslichen Nährstoffe wie Milch enthält, muß man sich darüber wundern, daß die Milchsäurebakterien so viel schlechter in Molke als in Milch gedeihen. Von vornherein sollte man ja nicht annehmen, daß die Milchsäurebakterien, die im Leben keine proteolytischen Enzyme ausscheiden, im Stande wären, kolloidale Eiweißkörper anzugreifen. Der folgende Versuch zeigt indessen, daß die Milchsäurebakterien Kaseinate ebenso gut wie Wittepepton ausnützen können. Der Grund, warum sie so schlecht in Molke gedeihen, muß deshalb der Mangel an Kaseinaten sein. Als Kaseinat haben wir ein A-Vitamin-freies Dinatriumkaseinat vom British Drug House benutzt, das wir stets für unsere Vitaminversuche verwendeten. Außer Kaseinat und Wittepepton in Molken gelöst, haben wir zum Vergleich auch Lösungen dieser Stoffe in Wasser mit Milchzucker und Nährsalzen hinzugenommen. Sämtliche Lösungen waren auf einen Stickstoffgehalt von 0,25% und auf einen pH von 6,5 eingestellt. Als Kontrolle haben wir noch verdünnte Milch desselben Stickstoffgehaltes benutzt. Titriert wurde nach 5 Tagen.

Tabelle 1.

Nahrungssubstrat	Bakterienart									
	Tbm. intestinale 314	Tbm. lactis 10	Tbm. bulgaricum	Tbm. helveticum	Sbm. casei 11	Sc. thermophilus 7	Sc. cremoris 18	Sc. cremoris 215	Sc. lactis 22	Sc. lactis 33
Zuckerlösung mit Wittepepton .	0,3	2,1	3,4	0,3	0,6	2,6	2,6	2,7	2,5	2,7
Zuckerlösung mit Kaseinat . .	0	0,5	0,7	0	0,5	1,1	0	0,9	1,4	1,1
Säuremolke	0,2	0,2	1,6	1,1	0,2	2,0	0,9	0	1,6	0,9
Säuremolke mit Wittepepton .	3,7	9,4	10,0	16,0	9,6	5,2	5,6	5,0	5,2	5,6
Säuremolke mit Kaseinat . . .	8,6	9,5	17,3	17,8	10,4	5,9	5,4	3,8	4,5	4,7
Labmolke	0,5	0,2	1,4	4,3	2,5	2,3	2,3	0,9	2,3	2,0
Labmolke mit Wittepepton . .	7,9	8,8	9,2	14,9	9,2	4,7	4,7	4,1	4,1	4,3
Labmolke mit Kaseinat	7,4	11,0	12,8	13,1	10,1	5,6	5,2	3,8	5,0	4,7
Verdünnte Milch	5,4	14,0	11,9	14,6	8,1	3,8	4,5	3,8	4,3	3,8

Diese Tabelle zeigt deutlich, daß als Zusatz zur Molke Kasein in kolloidem Zustande als eine ebenso gute Stickstoffquelle bei den Milchsäurebakterien wirkt wie Wittepepton. Diese Stoffe, in Zuckernährsalzlösung gelöst, geben dagegen ebenso schlechte Nährböden, wie es die Säuremolke ist, jedoch aus verschiedenen Gründen. Die Lösungen, weil ihnen die nötigen Aktivatoren

fehlen, und die Molke, weil ihr die nötigen Stickstoffverbindungen fehlen. Da die Säuremolke wie die Labmolke von Albumin befreit sind, und die Milchsäurebakterien, wenn Wittepepton oder Kasein zugesetzt wird, gleichwohl ähnliche Säuremengen darin bilden können wie in der zu demselben Stickstoffgehalt verdünnten Milch, scheint das Albumin ohne Bedeutung für die Milchsäurebakterien zu sein. In einzelnen Fällen erreicht man sogar höhere Säuremengen in Molke mit den Zusätzen als in der verdünnten Milch. Dies rührt jedoch zum Teil daher, daß wir die Milch mit Zuckerwasser statt mit Molke verdünnt haben, wodurch wir auch ihren Gehalt an Aktivatoren herabgesetzt haben. Daß die Verdünnungsweise nicht ohne Bedeutung ist, geht aus der Tabelle 2 hervor, und wo wir künftig Milch verdünnt haben, haben wir deshalb dazu stets Molke verwendet. Wahrscheinlich ist es auch nicht ohne Bedeutung für Flaschenkinder, ob man ihre Milch mit Molke anstatt mit Rohrzuckerlösung verdünnt. Hierdurch wird dann auch der Milch ihre natürliche Zuckerart zugesetzt, und bekanntlich wirkt der Milchzucker günstig auf die Darmflora ein.

Tabelle 2.

Milch verdünnt zu 0,2% N mit	Bakterienart									
	Tbm. intestinale 314	Tbm. lactis 9	Tbm. lactis 10	Tbm. bulgaricum	Tbm. helveticum	Tbm. Jugurt 13	Sbm. casei 11	Sc. thermophilus 7	Sc. cremoris 18	Sc. lactis 22
Zuckerlösung	4,1	6,8	7,4	10,1	10,6	11,9	4,7	3,2	2,5	3,2
Säuremolke	7,9	17,8	10,1	16,9	17,1	19,4	8,1	4,1	4,1	3,6
Titriert nach Anzahl Stunden	142	116	116	116	116	116	142	142	142	142

Wie man in der mit aktiven Kohlen behandelten Milch eine ausgezeichnete Nährflüssigkeit der Milchsäurebakterien hat, der es nur an den nötigen Aktivatoren fehlt, und die deshalb zum Nachweis derselben sehr geeignet ist, so hat man in der enteiweißten Molke eine Flüssigkeit, welche die für die Milchsäurebakterien nötigen Aktivatoren enthält, aber eine äußerst schlechte Stickstoffquelle ist, und daher zum Nachweis der für die Milchsäurebakterien nötigen N-haltigen Stoffe, speziell der Aminosäuren, geeignet ist. Da die meisten Aminosäuren in reinem Zustande recht kostbar sind, haben wir uns damit begnügen müssen, mit Nährlösungen zu arbeiten, die nur 0,2% N enthielten und von dem ein Viertel aus der verwendeten Molke stammte. Bei der Zusammensetzung einer vollständigen Aminosäuremischung haben wir ähnliche Verhältnisse zwischen den einzelnen Aminosäuren gewählt, wie sie im Kasein vorkommen. Wir haben jedoch Glykokoll hinzugenommen, trotzdem es im Kasein nicht nachgewiesen ist, es kommt aber in Laktalbumin vor. Es war überflüssig, Ammoniak zuzusetzen, weil eine Spur davon in der Molke vorhanden ist. Dagegen haben wir außer Asparaginsäure auch Asparagin zugesetzt, weil Virtanen gezeigt hat[1]), daß die Getreidesorten sich gegenüber diesen zwei Stickstoffquellen ganz verschieden verhalten. Während sie Asparaginsäure nicht ausnützen können,

[1]) Bericht des Chemikerkongresses. Oslo 1933.

ist für sie Asparagin ebenso wertvoll wie Nitrat. Als Beispiel geben wir nachfolgende Mischung, die in 360 ccm Molke gelöst eine Nährlösung mit 0,2% N ergibt, welche die Ansprüche der Milchsäurebakterien in jeder Hinsicht befriedigt.

Tabelle 3.

g	Aminosäuren	mit % N	g N
0,1	Glykokoll	18,67	0,0187
0,15	Alanin	15,73	0,0235
0,35	d-l-Valin	11,96	0,0420
0,3	l-Leucin	10,69	0,0321
0,2	d-Isoleucin	10,69	0,0214
0,2	Phenylalanin	8,50	0,0170
0,25	Tyrosin	7,74	0,0193
0,35	l-Prolin	12,17	0,0427
0,2	l-Oxyprolin	10,68	0,0214
0,25	l-Histidin	25,96	0,0650
0,1	l-Tryptophan	13,80	0,0138
0,3	d-Lysindichlorhydrat	12,80	0,0384
0,25	d-Arginin	32,18	0,0805
0,1	Asparaginsäure	10,53	0,0105
0,1	Asparagin	21,22	0,0212
0,6	Glutaminsäure	9,50	0,0570
0,1	Cysteinchlorhydrat	8,80	0,0088
360,0	Sauremolke	0,052	0,1872
360 ccm	Nahrsubstrat	0,2	0,7205

Von der reinen Molke abgesehen sind in der Tabelle 4 sämtliche Nährsubstrate auf 0,2% N und auf den p_H der Milch eingestellt. Die verwendeten Zuckerlösungen enthielten außer 2% Milchzucker 5‰ K_2HPO_4, 1‰ $MgSO_4$, 1‰ NaCl und 0,01‰ $FeCl_3$. Wenn hierin obige Aminosäuremischung gelöst wird, bekommt man ein Nährsubstrat, in welchem die Milchsäurebakterien gar nicht oder nur äußerst schwach wachsen, weil es keine Aktivatoren enthält. In einer Lösung dieser Aminosäuren in Molke bilden die Milchsäurebakterien dagegen ebenso viel Säure — teils etwas mehr und teils etwas weniger — wie in Molke mit Wittepepton. Titriert wurde nach 5 Tagen.

Tabelle 4.

Nährsubstrat	Bakterienart									
	Tbm. intestinale 314	Tbm. lactis 10	Tbm. bulgaricum	Tbm. helveticum	Sbm. casei 11	Sc. thermophilus 7	Sc. cremoris 18	Sc. cremoris 215	Sc. lactis 22	Sc. lactis 33
Zuckerlösung mit Wittepepton .	0	0	0	0	0,9	3,8	0,7	2,5	1,1	0,7
Zuckerlösung mit Aminosäuremischung	0	0,1	0	0	0,1	0,5	0	0	0 1,	0
Molke mit Wittepepton	1,9	1,5	9,7	14,0	8,6	4,1	4,3	4,7	5,0	4,3
Molke mit Aminosäuremischung	3,4	7,9	15,8	12,8	7,4	4,1	3,2	4,1	3,8	3,2
Molke ohne Zusatz	1,5	0,3	4,3	2,0	0	2,3	0,7	0,3	1,1	0,7

Zu den folgenden Versuchen, in welchen die Aktivatoren der Milch eine Hauptrolle spielen, haben wir nur solche Milchsäurebakterien, welche

mit Vorliebe in Milch wachsen, benutzt. Deshalb kommen Betabakterien, Betakokken und pathogene Streptokokken nicht in Betracht. Auch Thermobacterium intestinale (Bacillus acidophilus), das als Darmbakterium andere Aktivatoren, als die, welche in der Milch vorkommen, nötig hat, ist nicht mehr hinzugenommen.

Tabelle 5.

Molke mit Aminosäuremischung	Bakterienart							
	Tbm. lactis 10	Tbm. bulgaricum	Tbm. helveticum	Sbm. casei 11	Sc. thermophilus 7	Sc. cremoris 18	Sc. lactis 22	Sc. lactis 33
A (vollständige Aminosäuremischung) . .	13,3	18,0	12,8	7,2	4,1	3,8	3,8	2,9
B (physiologische Aminosäuremischung) .	7,9	7,0	12,6	5,9	4,1	2,7	2,5	2,3
B worin die Hälfte des Phenylalanins durch Tyrosin ersetzt worden ist	7,0	5,4	12,8	5,9	4,1	2,7	2,5	2,7
B worin das Ganze des Phenylalanins durch Tyrosin ersetzt worden ist	6,5	6,3	12,8	5,6	3,8	3,2	2,7	2,7
B ohne Histidin	5,9	8,3	12,6	5,0	2,7	1,8	2,0	1,8
B ohne Lysin	3,8	5,2	11,5	5,2	3,4	2,7	2,5	2,0
B ohne Tryptophan	7,9	5,2	12,8	6,8	3,4	2,0	2,3	2,0
B ohne Tryptophan und Histidin	5,6	5,0	12,6	5,4	2,9	2,3	2,3	2,0
B ohne Tryptophan und Lysin	5,9	5,0	12,4	5,9	3,4	2,5	2,5	2,3
B ohne Phenylalanin (und Tyrosin) . . .	5,9	5,2	11,9	5,2	2,9	2,3	2,0	2,0
B ohne Phenylalanin und Histidin . . .	4,3	5,0	12,4	5,4	3,2	2,5	2,3	2,0
B ohne Phenylalanin und Lysin	4,1	4,7	11,9	6,8	2,9	2,5	2,3	2,3
B ohne Cystein	2,3	10,6	10,1	1,4	2,9	2,7	2,9	3,4
B ohne Cystein und Histidin	2,0	9,2	10,1	1,1	2,3	2,0	2,0	3,2
B ohne Cystein und Lysin	1,4	7,4	8,1	1,6	2,7	2,7	2,7	2,9
C (B, worin Glykokoll + Alanin durch Ammoniak ersetzt worden ist)	2,5	8,8	11,5	6,3	4,3	2,0	2,7	2,5
C ohne Tryptophan	2,9	5,4	11,9	6,5	3,8	2,3	2,7	2,3
C ohne Phenylalanin (und Tyrosin) . . .	5,2	4,5	11,5	7,2	4,1	1,8	2,3	2,0
C ohne Cystein	1,4	7,9	10,1	0,5	3,8	2,9	3,2	3,6
C ohne Cystein, Tryptophan und Phenylalanin	1,4	3,6	3,4	1,1	3,6	3,4	2,9	3,6

In der Tabelle 5 ist obenerwähnte vollständige Aminosäuremischung mit A bezeichnet. Wir haben jedoch noch etwas Diketopiperazin zugesetzt, ein Stoff, der besonders nach den Untersuchungen von Troensegaard [1]) ein nicht unwesentlicher Baustein der Eiweißkörper ist, dessen physiologische Bedeutung indessen umstritten ist. Um darüber Klarheit zu gewinnen, welche der Aminosäuren der Mischung für unsere Milchsäurebakterien unentbehrlich, und welche entbehrlich sind, haben wir von denselben eine nach der anderen weggelassen und den entstandenen Stickstoffverlust durch eine größere Menge von Glykokoll und Alanin ersetzt, indem wir davon ausgegangen sind, daß diese einfachen Aminosäuren keine physiologische Bedeutung für die Milchsäurebakterien haben. In dieser Weise haben wir stets unsere Nährlösungen auf 0,2% N gehalten. Zu demselben Zweck benutzten wir auch Ammoniumcitrat mit einer geringen Menge von Ammoniumchlorid und Ammoniumsulfat. Wir sorgten ferner dafür, daß unsere Lösungen

[1]) Spaltprodukte aus hydrierten Proteinen. (Hoppe-Seylers Ztschr. f. physiol. Chemie. Bd. 193. 1930. S. 171.)

nach der Sterilisierung den optimalen p_H der betreffenden Bakterien besaß, 6,5 für die Streptokokken und 6,2 für die Stäbchen.

Zu einer ersten Orientierung benutzten wir eine wesentlich einfachere Aminosäurelösung, welche nur die Aminosäuren, die sich in der Ernährung der höheren Tiere als unentbehrlich herausgestellt hatten, enthielt, nämlich Cysteïn, Tryptophan, Phenylalanin, Lysin und Histidin. Da bei den Tieren Tyrosin und Phenylalanin einander ersetzen können, zogen wir in unseren ersten Versuchen vor, die letztere weniger schwerlösliche Aminosäure zu verwenden. Übrigens haben wir auch untersucht, ob die Milchsäurebakterien sich ähnlich wie die Tiere in dieser Hinsicht verhalten. Die Ergebnisse gehen aus der Tabelle 5 hervor. Wie gesagt, wurden als Lückenbüßer entweder Glykokoll + Alanin oder Ammoniumsalze verwendet. In der Tabelle 5 ist die physiologische Aminosäuremischung mit den zwei letztgenannten Aminosäuren mit B und dieselbe Mischung mit Ammoniumsalzen mit C bezeichnet. Titriert wurde nach 4 Tagen.

Um diese Tabelle richtig zu deuten, muß man wissen, daß man keineswegs immer die gleiche Säuremenge erhält, wenn man gleichzeitig 10 Röhren eines bestimmten Nährsubstrates mit demselben Milchsäurebakterium impft. Wo es möglich ist, nehmen wir immer den Durchschnitt von solchen 10 Röhren. Hier setzten die teuren Aminosäuren eine Grenze für die Menge Nährsubstrat, die wir verwenden konnten. Eine Kontrolle für die Ergebnisse hatten wir übrigens durch die Wiederholung der Versuche unter variierten Bedingungen.

Was zuerst in die Augen fällt ist, daß die vollständige Aminosäuremischung (A) für Thermobacterium lactis 10 und Tbm. bulgaricum wesentlich besser als die physiologische Aminosäuremischung (B) ist. Diese Thermobakterien stellen somit größere Ansprüche an die Stickstoffnahrung als die höheren Tiere. Was die anderen Milchsäurebakterien betrifft, so scheint das nämliche nicht der Fall zu sein. Thermobacterium helveticum und Streptococcus thermophilus wachsen völlig gleich gut in A und B, und Streptobacterium casei und die übrigen Streptokokken bilden in einzelnen Fällen ebensoviel Säure in C (eine noch einfachere Mischung als B) wie in A. Ein deutlicher Unterschied in der Wirkung von Phenylalanin und Oxyphenylalanin (Tyrosin) geht nicht aus der Tabelle 5 hervor. Wenn diese beiden Aminosäuren wegfallen, bilden die Milchsäurebakterien meistens etwas weniger Säure. Der Ausschlag für Histidin und Lysin ist auch nicht sehr deutlich. Der Wegfall von Histidin scheint schädlich für die Streptokokken, und der Wegfall von Lysin scheint schädlich für die Thermobakterien zu sein. Ergänzende Versuche haben dies bestätigt. Sonderbarerweise scheint das für die Tiere so wichtige Tryptophan nicht notwendig für die Milchsäurebakterien zu sein. Durch Wegfall des Tryptophans wird zwar etwas weniger Säure von Sc. cremoris 18 und Sc. lactis 33 gebildet, wenn man die Aminosäuremischung B verwendet, da sich dies indessen nicht wiederholt mit der Aminosäuremischung C, so muß dieses Ergebnis einem Zufall zuzuschreiben sein. Da es schwer zu entscheiden ist, ob vielleicht die verwendete Molke bereits eine für die Milchsäurebakterien genügende Menge Tryptophan enthielt, kommen wir auf diesen Punkt in den Versuchen mit den rein synthetischen Lösungen zurück. Den deutlichsten Ausschlag gibt das Cysteïn. Diese Aminosäure ist von großer Bedeutung für Streptobacterium casei und Thermobacterium lactis und von

etwas geringerer Bedeutung für das gegenüber Änderungen in der Stickstoffnahrung überhaupt wenig empfindliche Thermobacterium helveticum. Cysteïn scheint dagegen schädlich für Thermobacterium bulgaricum. Spätere Versuche haben jedoch gezeigt, daß dieses Bakterium ebensowenig wie die anderen Thermobakterien Cysteïn entbehren kann, nur bekommt es bald des Guten zu viel, was damit zusammenhängt, daß diese Aminosäure in hohem Grade das Redoxpotential der Nährlösung beeinflußt. Beim gleichzeitigen Wegfall von Tryptophan und Phenylalanin hat Tbm. bulgaricum auch unter dem Wegfall von Cysteïn gelitten. Was die Streptokokken betrifft, so hat für sie Cysteïn keine günstige, sondern eher eine ungünstige Wirkung, was auch durch spätere Versuche bestätigt worden ist. Von Tbm. lactis abgesehen, wachsen die geprüften Milchsäurebakterien gleich gut, einerlei ob ihnen Glykokoll + Alanin oder Ammoniaksalze zur Verfügung stehen, ja Streptobakterien und Streptokokken ziehen meistens die letzteren vor.

Nach dieser ersten Orientierung wollen wir die drei hier studierten Genera der Milchsäurebakterien, Thermobakterien, Streptobakterien und Streptokokken jedes für sich behandeln.

Zuerst wollen wir versuchen, ausfindig zu machen, warum Tbm. lactis 10 und Tbm. bulgaricum besser in der vollständigen Aminosäurelösung als in der physiologischen Aminosäurelösung gedeihen. Von letzterer lassen wir Tryptophan weg und ersetzen vorsichtshalber die Hälfte des Phenylalanins durch Tyrosin wie in A. Die physiologische Lösung, welche jetzt nebst Glykokoll + Alanin aus Cysteïn, Lysin, Histidin, Tyrosin und Phenylalanin besteht, wird in der Tabelle 6 mit D bezeichnet. Titriert wurde nach 6 Tagen.

Tabelle 6.

Nährsubstrat	Bakterienart				
	Tbm. lactis 9	Tbm. lactis 10	Tbm. bulgaricum	Tbm. helveticum	Tbm. Jugurt 13
Milch mittels Molke auf 0,2% N eingestellt	4,1	6,5	11,7	11,7	10,1
Molke mit A	19.6	17,3	19,4	17,1	16,7
„ „ A und Glutathion	20,7	11,7	19,4	18,9	20,0
„ „ D	18,7	11,0	11,5	16,0	17,1
„ „ D und Glutathion	18,5	3,8	11,9	17,1	20,3
„ „ D und Tryptophan	18,9	11,5	11,7	17,1	17,8
„ „ D und Leucin	18,9	10,8	12,2	16,0	18,0
„ „ D und Prolin	18,0	10,4	10,8	16,2	18,5
„ „ D und Leucin + Prolin	18,9	9,2	12,4	15,8	17,6
„ „ D und Arginin	18,5	13,1	14,0	16,7	18,9
„ „ D und Asparaginsäure	18,7	15,8	11,9	18,5	19,6
„ „ D und Asparagin	18,9	16,2	13,1	18,7	19,6
„ „ D und Leucin + Asparagin	18,5	16,2	11,5	17,3	18,5
„ „ D und Glutaminsäure	19,6	10,7	13,1	17,1	20,0
„ „ D und Diketopiperazin	19,1	12,4	12,4	16,4	19,1
„ „ D und Ammoniaksalzen	19,1	11,7	12,8	17,8	18,5
„ ohne Zusatz	0,5	0,2	5,9	2,5	0,9

Das wichtigste Ergebnis dieser Tabelle ist, daß die geprüften Thermobakterien, die alle spezifische Milchbakterien sind, nach 6 Tagen bei 37° C

nicht nur in der vollständigen Aminosäurelösung sondern auch in der physiologischen Aminosäurelösung, mehr Säure gebildet haben als in Milch, die mit Molke auf denselben N-Gehalt (0,2%) eingestellt worden ist. Eine Ausnahme bildet freilich Tbm. bulgaricum, das — trotzdem es in Molke ohne Zusatz relativ gut wächst — in D nur ebensoviel Säure wie in der verdünnten Milch gebildet hat. Dies beweist, daß unsere Thermobakterien in Molke mit A die notwendige N-Nahrung haben, und daß ihnen in Molke mit D keine sehr lebenswichtigen Stoffe fehlen können. Der Zusatz von Tryptophan hat auch hier keinen nennenswerten Ausschlag gegeben. Mit Ausnahme von Glutathion sind die verwendeten Zusätze alle solche, die bereits in der vollständigen Aminosäuremischung vorkommen, denn mit diesem Versuch beabsichtigten wir gerade die Aminosäuren zu finden, welche bedingen, daß Tbm. lactis 10 und Tbm. bulgaricum besser in A als in D gedeihen. Für Tbm. lactis 10 haben wir in Asparaginsäure oder noch besser in Asparagin die fehlende Substanz. Dagegen verlangt Tbm. bulgaricum wahrscheinlich den Zusatz von mehreren N-haltigen Substanzen auf einmal, denn es gelingt nicht, mit einer Aminosäure allein D mit A gleichwertig zu machen. Am besten scheint Arginin zu wirken. Wie im vorigen Versuch gedeiht Tbm. helveticum fast ebensogut in D wie in A, und das gleiche gilt für Tbm. lactis 9 und Tbm. Jugurt. Glutaminsäure (und vielleicht Diketopiperazin) wirkt günstig auf Tbm. lactis 9 und Tbm. Jugurt, und Asparagin (Asparaginsäure) wirkt günstig nicht nur auf Tbm. lactis 10, sondern auch auf Tbm. helveticum und Tbm. Jugurt. Wenn wir deshalb für die Thermobakterien die einfachste und doch beste Aminosäuremischung herstellen wollen, so müssen wir außer den Aminosäuren, die in D vorhanden sind, noch Asparagin, Glutaminsäure und Arginin zufügen.

Obwohl wir in unserer Arbeit über den Vitaminbedarf der Milchsäurebakterien gezeigt haben, daß Glutathion im Vergleich zu Laktoflavin ohne Bedeutung für die Milchsäuregärung ist, so haben wir es doch in dieser Versuchsreihe mitgenommen, weil man nicht wissen konnte, ob diesem Tripeptid vielleicht als Baustein eine Rolle zukommt. Aus der Tabelle 6 geht hervor, daß Glutathion meistens günstig auf die Thermobakterien einwirkt, nur gegenüber Tbm. lactis 10 wirkt es, besonders wenn die physiologische Aminosäuremischung D verwendet wird, sehr schädlich. Dies steht in Übereinstimmung mit unseren früheren Befunden[1]), und aus diesem Grunde dürfen wir unserer obigen Aminosäuremischung nicht noch Glutathion zufügen.

Die Streptobakterien sind bezüglich der Stickstoffnahrung weit weniger anspruchsvoll als die Thermobakterien, was die Berechtigung, sie als ein besonderes Genus der stäbchenförmigen Milchsäurebakterien aufzustellen, verstärkt. Wie die Tabelle 7 zeigt, können die Streptobakterien sich mit Ammoniaksalzen begnügen, wenn sie nur daneben eine Spur von Cysteïn bekommen. Titriert wurde nach 6 Tagen.

Andere Versuche haben gezeigt, daß Sbm. casei in Molke mit Cysteïn und Ammoniaksalzen ebensoviel Säure bilden können wie in Molke mit der vollständigen Aminosäuremischung A. Dies ist dagegen nicht der Fall bezüglich Sbm. plantarum. Hierfür ist noch etwas Histidin und Lysin notwendig.

---

[1]) Der Vitaminbedarf der Milchsäurebakterien (Tab. 7 a).

Tabelle 7.

Nährsubstrat	Bakterienart				
	Sbm. casei 11	Sbm. casei 34	Sbm. plantarum 14	Sbm. plantarum 21	Sbm. plantarum 33
Milch mittels Molke auf 0,2% N eingestellt	7,2	2,9	4,5	0,7	6,3
Molke mit 0,15% Cystein N	0	0	0	0	0
„ „ 0,015% Cystein N und Ammoniaksalzen	9,7	8,8	3,2	4,1	4,7
Molke mit 0,0015% Cystein N und Ammoniaksalzen	9,7	7,0	3,2	3,2	6,3
Molke mit 0% Cystein N und Ammoniaksalzen	0,3		2,0		

Was endlich die Streptokokken betrifft, so können sie sich wie die Streptobakterien, wenn sie in Molke gezüchtet werden, mit Ammoniaksalzen begnügen, aber im Gegensatz zu den Streptobakterien gedeihen sie, wie schon gezeigt, besser ohne Cysteïn. Sie kommen jedoch erst auf die maximale Säurebildung, wenn man noch ein wenig Aminosäure zusetzt, und hier scheint nach der Tabelle 8 eine Mischung von Histidin und Leucin die günstigste Wirkung auszuüben. Auch hier wurde erst nach 6 Tagen titriert.

Tabelle 8.

Nährsubstrat	Bakterienart					
	Sc. thermophilus 7	Sc. cremoris 18	Sc. lactis 22	Sc. faecium 6	Sc. glycerinaceus 1	Sc. liquefaciens 1
Milch mittels Molke auf 0,2% N eingestellt	4,1	3,8	4,3	2,9	2,7	5,0
Molke mit der vollständigen Aminosäuremischung A	4,3	4,1	4,3	3,4	3,8	3,8
Molke mit Ammoniaksalzen, Histidin u. Leucin	4,5	5,4	4,5	3,4	3,6	5,0
„ „ Ammoniaksalzen und Histidin . .	2,6	4,7	4,1	3,0	2,7	4,3
„ „ Ammoniaksalzen und Leucin . . .	2,6	5,0	4,3	3,4	3,2	4,5
„ „ Ammoniaksalzen und Alanin . . .	2,5	4,1	3,8	2,7	2,5	4,1
„ „ Ammoniaksalzen und Glykokoll .	2,5	3,4	3,4	2,5	2,3	3,8
„ „ Ammoniaksalzen und Asparagin .	2,3	3,4	3,4	2,5	2,5	3,8
„ „ Ammoniaksalzen allein	2,3	4,5	3,8	2,7	2,7	4,3

Daß wir in obiger Versuchsreihe in einigen Fällen etwas höhere Säuremengen erhalten haben in Molke, der anstatt der vollständigen Aminosäuremischung A nur Ammoniaksalze, Histidin und Leucin zugesetzt worden war, rührt von der für die Streptokokken schädlichen Wirkung des in A vorhandenen Cysteïns her.

Wie wir in der Arbeit: „Der Vitaminbedarf der Milchsäurebakterien" über die notwendigen Wachstumsfaktoren dieser Bakterien aufgeklärt worden sind, so sind wir nun über die notwendige Stickstoffnahrung der verschiedenen Milchsäurebakterien soweit orientiert, daß man es für eine leichte Aufgabe

halten sollte, für die Milchsäurebakterien synthetische Lösungen herzustellen, in welchen sie ebenso gut gedeihen, wie in den natürlichen Nährsubstraten. Wir werden nichtsdestoweniger sehen, daß wir bei Lösung dieser Aufgabe noch Schwierigkeiten zu überwinden haben.

Zu den synthetischen Substraten verwendeten wir von Salzen außer den geringen Mengen, die im Leitungswasser vorkamen, 5‰ K_2HPO_4, 1‰ $MgSO_4$, 1‰ NaCl, 0,01‰ $FeCl_3$ und ähnliche geringe Mengen von Cu und Zn, welche in der Milch vorhanden sind. Außer 2% Traubenzucker haben wir anfänglich noch 0,5‰ Inosit und 1‰ Arabinose zugesetzt. Wir verwendeten Inosit lediglich, weil es sich im Bioskomplex der Hefe findet, und Arabinose, weil S. Orla-Jensen gezeigt hat, daß Pentosen unter Umständen das Wachstum der Milchsäurebakterien ebenso stark begünstigen können wie Methylglyoxal[1]). Diese Zusätze zeigten sich indessen für die vorliegende Aufgabe wertlos. Das nämliche war auch der Fall mit dem Zusatz einer Spur von Rhodaniden, welche einzelne Forscher behaupten in der Milch nachgewiesen zu haben. Da Milch und Molke Zitronensäure, Ammoniak und Kreatin enthalten, haben wir unseren Nährlösungen stets entsprechende Mengen Diamoniumzitrat und Kreatin zugesetzt. Der letztere Stoff, der bekanntlich ein wesentlicher Bestandteil des Fleischextraktes ist, begünstigt — zwar nur in geringem Maße — die Entwicklung der Milchsäurebakterien.

Bei unseren Versuchen wurde stets die Wirkung von Hefenucleinsäure geprüft, weil man von vornherein nicht wissen konnte, ob die Milchsäurebakterien neben den Aminosäuren noch besondere Kernsubstanzen zu ihrem Wachstum nötig haben. Ferner wurde die Wirkung von proteolytischen Enzymen und Wittepepton geprüft, obwohl unsere Lösungen durch den Zusatz derartiger Stoffe von unbekannter Zusammensetzung nicht mehr als rein synthetische erachtet werden konnten. Die Wirkung der proteolytischen Enzyme wurde geprüft, weil wir in der Arbeit über Wuchsstoffe in den Peptonen gezeigt haben, daß diese Enzyme thermostabile Stoffe enthalten, die das Wachstum der Milchsäurebakterien begünstigen, und weil die Molke ein proteolytisches Enzym, die Galaktase, enthält. Die Wirkung von Wittepepton wurde geprüft um festzustellen, ob die Milchsäurebakterien außer den einfacheren Eiweißzersetzungsprodukten noch einige der komplizierteren intermediären Produkte benötigen. Die genannten Zusätze wurden (wo nichts anders erwähnt ist) jedoch nur in ganz geringen 0,1‰ N entsprechenden Mengen verwendet. Eine ähnliche Stickstoffmenge rührte vom zugesetzten Bios her. Wenn kein fremder Zusatz benutzt wurde, verwendeten wir etwas mehr Glykokoll als sonst, um den Stickstoffgehalt unserer Nährlösungen stets auf 2,2‰ zu halten.

Was die Thermobakterien betrifft, so haben die Molkenversuche gezeigt, daß sie zum optimalen Gedeihen folgende Aminosäuren benötigen: Cysteïn, Tyrosin, Phenylalanin, Lysin, Histidin, Arginin, Glutaminsäure und Asparagin. Dazu übt, wie erwähnt, Kreatin auch noch eine günstige Wirkung aus. Als Lückenbüßer wurden Glykokoll, Alanin und Ammoniumzitrat zugesetzt. In unseren ersten Versuchen wurden ferner kleine Mengen von Tryptophan, Diketopiperazin und Glutathion zugesetzt, weil wir noch nicht wußten, ob der Grund, warum diese Stoffe keine nennenswerte Wirkung gezeigt haben, vielleicht der war, daß sie bereits in der Molke in genügender

[1]) Hitherto unknown Activators for the growth of Lactic Acid Bacteria. (Journ. of the Society of Chemical Industry. Vol. 52. 1933.)

Menge vorhanden wären. Endlich wurde pr. L Nährsubstrat 0,5 mg Laktoflavin und die in Milch vorkommende Biosmenge zugesetzt. Diese Mischung wurde mit E bezeichnet.

Tabelle 9.

‰ N in Form von	Bakterienart							
	Tbm. lactis 9		Tbm. lactis 10		Tbm. bulgaricum		Tbm. helveticum	
2,1 als E + 0,1 als Glykokoll	2,5	5,2	0	1,9	2,0	3,3	0,6	2,4
2,1 als E + 0,1 als Hefenucleinsäure	3,8	5,6	0	2,0	2,9	3,9	0,8	2,9
2,1 als E + 0,1 als Pepsin	3,6	6,3	0	3,5	3,2	4,8	1,8	4,0
2,1 als E + 0,1 als Pankreatin	4,3	6,5	3,4	5,8	2,3	3,6	3,8	6,8
2,1 als E + 0,1 als Wittepepton	6,1	10,1	1,1	8,0	3,8	5,3	2,3	4,7
1,1 als E + 1,1 als Wittepepton	9,2	11,1	2,9	8,1	4,5	5,5	3,4	4,1
0 als E + 2,2 als Wittepepton	8,1	10,2	3,6	6,4	6,1	6,5	2,9	4,9
0 als E[1]) + 2,2 als Wittepepton	2,5	3,5	0,3	0,7	0,5	1,6	0	0,5
Titriert nach Anzahl Stunden	46	94	46	94	46	94	46	94

[1]) Ohne Zusatz von Bios und Laktoflavin.

Erinnert man sich, daß die Thermobakterien in Molke mit der optimalen Aminosäuremischung 10—20‰ Säure bilden können, so sind unsere Ergebnisse mit der synthetischen Nährlösung, wie sie aus der Tabelle 9 hervorgehen, wenig befriedigend. Wachstum haben wir zwar, jedoch nur spärlich, und die Stäbchen sind relativ dünn. Ihre Volutinkörnchen sind indessen von normaler Größe, und somit dicker als die Stäbchen. Sie sind daher vergleichbar dem Körper eines mageren Tieres, dessen Rippen deutlich vorstehen und, wie stets unter ungünstigen Verhältnissen, färben sie sich mit Methylenblau rot statt blau. Da der Mangel an irgendeiner der für die Milchsäurebakterien notwendigen Aminosäuren meistens nur einen kleinen Ausschlag gibt, ist nicht daran zu zweifeln, daß das schlechte Wachstum und die geringe Säurebildung der Thermobakterien in der synthetischen Lösung nicht von einem solchen Mangel, sondern eher vom Mangel eines uns unbekannten, noch in der Molke vorhandenen Aktivators herrührt. Für diese Auffassung spricht auch der Umstand, daß die stäbchenförmigen Milchsäurebakterien weder in Kaseinpepton (C) mit einem Zusatz von Laktoflavin und Bios noch in 2 C (mit doppelt so viel Stickstoff wie die Milch) so viel Säure bilden wie in Milch. Der Unterschied ist besonders groß bei Thermobacterium helveticum, was aus der Tabelle 2 in der Arbeit „Über Wuchsstoffe in den Peptonen“ hervorgeht. Wir kommen später auf diesen Punkt zurück.

Die Tabelle 9 zeigt, daß alle die zugesetzten Stoffe und besonders das Wittepepton günstig wirken. Die größte Säuremenge erhält man meistens mit gleichen Teilen Aminosäuremischung und Wittepepton. Beim Wegfall der Aktivatoren bilden die Thermobakterien in einer reinen Wittepeptonlösung nur wenig Säure.

Nach unseren Molkenversuchen beanspruchen die Streptobakterien von N-haltigen Substanzen nur Ammoniaksalze und ein wenig Cysteïn, wachsen aber noch besser nach Zusatz von noch etwas Glutaminsäure und Kreatin. In unseren ersten Versuchen wurden ferner wie bei den Thermobakterien Tryptophan, Diketopiperazin und Glutathion zugesetzt. Diese Mischung

von Stickstoffsubstanzen mit Bios und Laktoflavin ist in Tabelle 10 mit F bezeichnet. Die Ergebnisse waren nicht wesentlich besser als für die Thermobakterien, trotzdem die Stickstoffnahrung vielseitiger als unbedingt notwendig war. Mit gleichen Teilen von F und Wittepepton wurde doch fast ebensoviel Säure produziert wie in Molken mit den nötigen Stickstoffsubstanzen (siehe die Tabelle 7), und mit F allein bilden die Streptobakterien ebensoviel Säure wie mit Wittepepton mit den zwei Aktivatoren und bedeutend mehr als in Wittepepton ohne Aktivatoren.

Tabelle 10.

‰ N in Form von	Sbm. casei 11	
2,1 als F + 0,1 als Glykokoll	1,4	3,4
2,1 als F + 0,1 als Hefenucleinsaure . .	3,5	3,5
2,1 als F + 0,1 als Pepsin	2,3	4,0
2,1 als F + 0,1 als Pankreatin	2,0	4,5
2,1 als F + 0,1 als Wittepepton	2,5	5,6
1,1 als F + 1,1 als Wittepepton	6,3	7,2
0 als F + 2,2 als Wittepepton	0,6	3,2
0 als F[1]) + 2,2 als Wittepepton . . .	0,5	1,7
Titriert nach Anzahl Stunden	65	113

[1]) Ohne Zusatz von Bios und Laktoflavin.

Was endlich die Streptokokken betrifft, gedeihen sie nach den Molkenversuchen mit nur Ammoniaksalzen als Stickstoffquelle. Eine gute Wirkung üben jedoch noch Zusätze von Histidin, Leucin und Kreatin aus. In unseren ersten Versuchen wurden auch hier vorsichtshalber Tryptophan, Diketopiperazin und Glutathion zugesetzt. Als Aktivator wurde nur Bios verwendet. Die Mischung dieser Stoffe ist mit G bezeichnet.

Tabelle 11.

‰ N in Form von	Bakterienart					
	Sc. thermophilus 7		Sc. cremoris 18		Sc. lactis 22	
2,1 als G + 0,1 als Glykokoll	4,3	4,6	1,4	2,5	0,9	2,0
2,1 als G + 0,1 als Hefenucleinsäure .	5,2	5,7	2,0	3,6	1,8	3,4
2,1 als G + 0,1 als Pepsin	4,5	5,2	3,6	4,2	2,5	3,4
2,1 als G + 0,1 als Pankreatin . . .	5,2	5,6	4,5	5,6	5,2	5,6
2,1 als G + 0,1 als Wittepepton . . .	5,2	5,5	3,6	5,3	3,0	3,6
1,1 als G + 1,1 als Wittepepton . . .	5,0	5,5	3,6	4,5	4,7	5,0
0 als G + 2,2 als Wittepepton . . .	3,2	3,2	2,9	3,3	3,0	3,4
0 als G[1]) + 2,2 als Wittepepton . .	3.2	3,6	1,0	1,8	2,6	3,0
Titriert nach Anzahl Stunden	46	94	46	94	46	94
Molke mit Ammoniaksalzen, Histidin und Leucin		4,5		5,4		4,5

[1]) Ohne Zusatz von Bios.

Aus der Tabelle 11 ersieht man, daß bezüglich Sc. thermophilus unser Ziel, die Bildung von ebensoviel Säure in einer rein synthetischen Nährlösung wie in Molke mit Ammoniaksalzen und Aminosäuren, erreicht

worden ist. Was die zwei anderen Streptokokken betrifft, wird dieses Ziel erst durch Zusatz einer geringen Menge eines Stoffes unbekannter Zusammensetzung, nämlich Pankreatin oder Wittepepton, erreicht. Reines Wittepepton wirkt entschieden schlechter als in Mischung mit G. Der Wegfall des Aktivators der Wittepeptonlösung ist nicht von der gleichen Bedeutung für die Streptokokken wie für die Milchsäurestäbchen. Hefenucleinsäure scheint eine größere Rolle für die Streptokokken als für die Milchsäurestäbchen zu spielen.

Bisher haben wir unseren synthetischen Lösungen neben den für die betreffenden Bakterien unbedingt notwendigen N-haltigen Nährstoffen sicherheitshalber noch Tryptophan, Diketopiperazin und Glutathion zugesetzt. Die Versuche mit enteiweißter Molke ergaben zwar, daß die Milchsäurebakterien Tryptophan nicht benötigen, hier war aber die Möglichkeit vorhanden, daß die Molke genügend dieser für das Leben der Tiere so wichtigen Aminosäure enthielt. Um sicher zu gehen, stellten wir deshalb Versuche mit synthetischen Lösungen mit und ohne Tryptophan an. Die Lösungen enthielten 0.22% N, wovon 0,02 von Tryptophan oder einer entsprechenden Menge Glykokoll herrührte. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in den Tabellen 12, 13 und 14 zusammengestellt. M bedeutet Molke und S synthetische Lösung.

Tabelle 12.

Überall sind den Lösungen die für die Thermobakterien notwendigen N-haltigen Stoffe zugesetzt worden	Bakterienart							
	Tbm. lactis 9		Tbm. lactis 10		Tbm. bulgaricum		Tbm. helveticum	
M ohne Tryptophan	13,7	20,0	5,0	17,8	11,9	13,3	14,4	18,2
M mit Tryptophan	15,3	21,2	4,7	18,0	12,6	13,3	16,9	17,6
S ohne Tryptophan	5,4	7,2	0,3	6,5	1,4	2,7	0,5	2,0
S mit Tryptophan	1,8	8,8	0,1	5,4	0,6	4,7	0	1,6
Titriert nach Anzahl Stunden .	43	116	43	116	43	116	43	116

Aus dieser Tabelle geht hervor, daß die Säurebildung der Thermobakterien durch den Zusatz von Tryptophan in der Molke-Aminosäurelösung meistens ein wenig verbessert, in den rein synthetischen Lösungen dagegen meistens ein wenig verschlechtert wird. Die Unterschiede liegen innerhalb der Fehlergrenzen, und man muß deshalb annehmen, daß die bezüglich der Stickstoffnahrung sonst so anspruchsvollen Thermobakterien Tryptophan nicht nötig haben.

Tabelle 13.

Überall sind den Lösungen die für die Thermobakterien notwendigen N-haltigen Stoffe zugesetzt worden	Streptococcus thermophilus +									
	Tbm. lactis 9		Tbm. lactis 10		Tbm. bulgaricum		Tbm. helveticum		O	
M ohne Tryptophan . . .	12,8	19,6			11,0	14,0	16,9	18,2	3,8	4,1
M mit Tryptophan . . .	15,8	21,4		18,5	12,8	16,2	17,1	17,1	3,8	4,3
S ohne Tryptophan . . .	7,4	11,7	6,1	9,2	5,4	5,6	5,0	7,4	4,3	5,6
S mit Tryptophan . . .	4,7	5,6	5,9	7,0	5,4	5,6	5,0	5,9	5,4	5,6
Titriert nach Anzahl Std.	43	116	43	116	43	116	43	116	43	116

Obige Schlußfolgerung wird durch die Tabelle 13 bestätigt. Hier sind die Thermobakterien mit Sc. thermophilus zusammen geimpft worden. Diese Mischinfektion kommt häufig vor. So trifft man Sc. thermophilus im Yoghurt mit Tbm. bulgaricum + Tbm. Jugurt und im frischen Emmentalerkäse mit Tbm. helveticum zusammen. Da die Thermobakterien bei einer etwas höheren Wasserstoffionenkonzentration als derjenigen der Milch ihr Optimum haben, ist anzunehmen, daß Sc. thermophilus den Thermobakterien den Weg bahnt. Vergleicht man die Zahlen in den Tabellen 12 und 13, so gelingt es jedoch nicht, diese Annahme zu bestätigen bezüglich der vollständigen Nährlösung, Molke mit Aminosäure, denn wahrscheinlich ist hier nach 43 Std. der Unterschied bereits ausgeglichen. Mit der weniger guten, synthetischen Nährlösung, in welcher die Entwicklung der Bakterien langsamer stattfindet, ist dagegen eine günstige Wirkung der Mischinfektion zu konstatieren. Nach 43 Std. übersteigt die gebildete Säuremenge in der Mischinfektion sogar in zwei Fällen (Tbm. lactis 10 und Tbm. helveticum) die Summe der Säuremengen, welche die zusammengeimpften Bakterien jede für sich bilden. Wie man sieht, wird Sc. thermophilus in Reinkultur auch nicht vom Tryptophan deutlich beeinflußt.

Die gleichen Versuche haben wir wiederholt mit Streptobacterium casei für sich allein und mit Streptococcus lactis und Streptococcus cremoris zusammengeimpft, eine Mischinfektion, die früher oder später in allen nicht stark nachgewärmten Käsen vorkommt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 14 zusammengestellt.

Tabelle 14.

Überall sind den Lösungen die für die Streptobakterien notwendigen N-haltigen Stoffe zugesetzt worden	Bakterien					
	Sbm. casei 11		Sbm. casei 11 Sc. lactis 22 Sc. cremoris 18		Sc. lactis 22 Sc. cremoris 18	
M ohne Tryptophan . . .	9,7	11,5	10,6	12,2	2,7	2,7
M mit Tryptophan . . .	9,5	11,3	10,6	12,8	2,9	3,2
S ohne Tryptophan . . .	2,0	2,5	4,7	5,4	3,8	4,1
S mit Tryptophan . . .	2,7	2,5	5,0	5,0	2,7	2,9
Titriert nach Anzahl Std.	116	139	116	139	116	139

Bei diesen Bakterien ist eine noch geringere Wirkung vom Tryptophan als bei den Thermobakterien zu spüren. Die größten Säuremengen erhält man, wenn Streptobakterien und Streptokokken zusammengeimpft sind. Im vollständigen Nährsubstrat scheint jedoch die Erhöhung äußerst gering zu sein. Die kürzeste Titrationszeit (116 Std.) mußte wegen des langsamen Wachstums der Streptobakterien recht langsam bemessen werden.

Ähnliche Versuche wie mit Tryptophan haben wir auch mit Diketopiperazin angestellt. Eine ganz geringe Wirkung dieser Aminosäure wurde den Streptobakterien gegenüber beobachtet. Auch mit Histidin haben wir Versuche angestellt. Diese Aminosäure, die auf die Entwicklung der Thermobakterien und der Streptokokken günstig wirkt, hat für Sbm. casei keinen Wert. Endlich haben wir die Bedeutung des Glutathions in synthetischen Lösungen näher geprüft, teils als Ersatz für Cysteïn (nach derselben Schwefelmenge berechnet) und teils als Zusatz zum Cysteïn. Da diese Ver-

suche mit Versuchen zur Ausfindung der noch fehlenden Aktivatoren kombiniert wurden, geben wir die Ergebnisse derselben in den folgenden Tabellen wieder.

Trotzdem wir in der Arbeit über den Vitaminbedarf der Milchsäurebakterien gezeigt haben, daß das B_1-Vitamin für die Milchsäurebakterien ohne Bedeutung ist, haben wir es doch für richtig gehalten, uns zu überzeugen, ob sich unsere synthetischen Lösungen durch Zusatz von B_1-Vitamin nicht verbessern ließen. Professor Windaus in Göttingen zeigte uns zu diesem Zwecke das große Wohlwollen, uns ein wenig seines kristallinischen Präparates zu überlassen. Es wurde in derselben Menge, 0,5 mg pro l, wie das Laktoflavin verwendet. Die Ergebnisse gegenüber den Thermobakterien und den Streptobakterien sind in der Tabelle 15 und gegenüber den Streptokokken in der Tabelle 16 zusammengestellt. Jede dieser Bakteriengruppen hat ihre spezifischen N-haltigen Stoffe bekommen, dazu erhielten, wie gewöhnlich, die Stäbchen Bios + Laktoflavin und die Streptokokken nur Bios. Gleichzeitig haben wir untersucht, was geschieht, wenn man den Stäbchen Glutathion statt Cysteïn, und den Streptokokken außer Bios noch Laktoflavin gibt.

Tabelle 15.

Synthetische Nährlösung mit Bios und Laktoflavin		Bakterienart									
		Tbm. lactis 9		Tbm. lactis 10		Tbm. bulgaricum		Tbm. helveticum		Sbm. casei 11	
mit Cystein	ohne B_1	0,8	5,9	1,1	2,5	0,2	1,8	1,6	2,5	0	2,0
	mit B_1	0,9	6,5	1,2	2,9	2,3	2,5	2,0	2,5	0.6	2,5
mit Glutathion	ohne B_1	1,1	6,5	1,4	1,6	1,8	1,1	2,7	3,2	2,0	3,2
	mit B_1	1,1	6,8	0,9	1,6	0,5	1,8	2,5	3,8	1,6	3,2
Titriert nach Anzahl Std.		29	144	95	144	95	144	95	144	95	144

Wie man sieht, gedeihen die hier geprüften Bakterien gleich schlecht, einerlei ob die Nährlösungen mit Cysteïn oder Glutathion bereitet sind oder ob dieselben B_1-Vitamin oder nicht enthalten. Nur bei Tbm. helveticum und Sbm. casei ist es vielleicht ein wenig vorteilhafter, Glutathion statt Cysteïn zu verwenden.

Tabelle 16.

Synthetische Nährlosung		Bakterienart					
		Sc. thermophilus 7		Sc. cremoris 18		Sc. lactis 22	
mit Bios allein	ohne B_1	4,1	5,0	1,1	3,6	1,7	2,9
	mit B_1	3,8	4,3	1,1	3,4	1,6	2,7
mit Bios und Laktoflavin	ohne B_1	4,3	5,0	1,4	4,1	1,6	3,4
	mit B_1	4,3	5,2	1,2	4,1	1,8	3,8
Titriert nach Anzahl Std.		29	144	29	144	29	144

Auch für die Streptokokken spielt der Zusatz von B_1-Vitamin keine Rolle. Dagegen erzeugen, wie wir es früher gesehen haben, Sc. cremoris

und Sc. lactis etwas mehr Säure mit Bios + Laktoflavin als mit Bios allein.

Aus unseren Versuchen mit synthetischen Aminosäurelösungen geht deutlich hervor, daß die stäbchenförmigen Milchsäurebakterien darin nicht zur vollen Entwicklung gelangen, auch nicht nach Zusatz von Milchbios und Laktoflavin, welche zwei Aktivatoren genügen, um die mit aktivierter Kohle behandelte Milch für die Milchsäurebakterien wieder vollwertig zu machen. Milch muß deshalb noch einen notwendigen Aktivator enthalten, der nicht an die Kohle adsorbiert wird. Daß dieser noch fehlende Aktivator nicht B_1-Vitamin ist, geht aus allen unseren Erwägungen hervor und ist oben experimentell bestätigt worden. Er muß dagegen in der enteiweißten Molke vorhanden sein, weil dieselbe nur durch Zusatz von Aminosäuren zu einem vorzüglichen Nährboden für die Milchsäurebakterien gemacht werden kann. Wir haben versucht, diesen Aktivator zu isolieren oder zu konzentrieren. Zu diesem Zwecke wurde mit aktiver Kohle behandelte Molke auf ein Fünftel im Vacuum eingeengt einen Tag kalt gestellt, damit möglichst viel Milchzucker auskristallisieren konnte, und filtriert. Dem Filtrat wurde so viel Alkohol zugesetzt, daß die Mischung 60% Äthylalkohol enthielt. Hierdurch bildete sich ein voluminöser eiweißartiger Niederschlag, der jedoch auf dem Filter nur sehr wenig ausmachte. Sowohl der Niederschlag wie auch das Filtrat nach Abdestillieren des Alkohols wurde als Aktivatorquelle versucht. Das Filtrat zeigte gar keine Wirkung in dieser Richtung, und der Niederschlag (P) hatte, wie die Tabellen 17 und 18 zeigen, kaum eine so große Wirkung, wie sie dieselbe Stickstoffmenge in Form von Wittepepton (W) ausübt. Unseren Nährlösungen wurde vom Niederschlag wie vom Milchbios gerade so viel zugesetzt, wie einem gleichen Volumen Molke entspricht. Auch die doppelte Menge P wurde verwendet. Die diesen Mengen entsprechenden Stickstoffmengen betrugen 0,01% bzw. 0,02%. In derselben Versuchsreihe haben wir die Bedeutung eines Sonderzusatzes von 0,2% Glutathion geprüft. Der totale Stickstoffgehalt sämtlicher Nährlösungen wurde mittels Glykokoll stets auf 0,22 eingestellt. Selbstverständlich haben wir den Thermobakterien, Streptobakterien und Streptokokken die für sie spezifischen Stickstoffverbindungen gegeben.

Tabelle 17.

Synthetische Nährlösungen mit Bios und Laktoflavin auf 0,22% N eingestellt	Bakterienart									
	Tbm. lactis 9		Tbm. lactis 10		Tbm. bulgaricum		Tbm. helveticum		Sbm. casei 11	
Mit Glutathion, ohne anderen Zusatz	4,5	6,8	1,6	3,2	1,2	2,0	2,0	3,6	2,0	2,3
Ohne Glutathion, ohne anderen Zusatz	4,5	6,8	2,3	4,3	1,1	4,0	2,5	3,4	2,0	2,5
Ohne Glutathion, mit 0,01% N als P	6,8	8,6	3,8	5,4	2,7	4,1	3,4	5,2	5,0	5,2
Ohne Glutathion, mit 0,02% N als P	7,2	9,5	4,1	6,8	3,4	5,4	4,1	6,3	5,4	5,9
Ohne Glutathion, mit 0,01% N als W	7,4	13,1	7,9	10,1	8,1	10,6	6,5	8,8	6,3	7,2
Ohne Glutathion, mit 0,02% N als W	10,4	14,0	9,5	11,7	6,5	10,1	7,4	10,6	8,3	8,6
Titriert nach Anzahl Std.	65	116	65	116	65	116	65	116	116	142

Tabelle 18.

Synthetische Nährlösung mit Bios, auf 0,22% N eingestellt	Bakterienart					
	Sc. thermophilus 7		Sc. cremoris 18		Sc. lactis 22	
Mit Glutathion, ohne anderen Zusatz	4,7	5,2	2,5	3,4	2,5	2,9
Ohne Glutathion, ohne anderen Zusatz	3,2	4,7	2,7	3,8	2,5	3,4
„ „ mit 0,01% N als P	3,8	5,4	2,5	4,3	3,4	3,8
„ „ mit 0,02% N als P	4,1	5,6	2,5	4,1	3,2	4,1
„ „ mit 0,01% N als W	4,3	6,1	3,2	4,3	2,5	2,7
„ „ mit 0,02% N als W	4,7	5,9	3,6	4,3	2,3	2,9
Titriert nach Anzahl Stunden	22	116	41	116	65	142

Wie erwähnt, geht aus diesen Tabellen hervor, daß der Molkenniederschlag (P) kaum einen Aktivator enthält, sondern nur eine Eiweißwirkung ausübt, die gegenüber den geprüften Bakterien (mit Ausnahme von Sc. lactis 22) geringer ist als die Wirkung einer entsprechenden Menge Wittepepton. Ferner zeigen diese Tabellen, daß die verwendeten Nährböden durch einen Zusatz von Glutathion nicht verbessert werden. Es ist hier daran zu erinnern, daß die Nährböden der Thermobakterien und der Streptobakterien Cysteïn enthalten, während der Nährboden der Streptokokken diese Aminosäure nicht enthält. Wir haben bereits gesehen (Tabelle 15), daß man auch nichts gewinnt, wenn Cysteïn durch Glutathion ersetzt wird, es ist deshalb ebenso wenig Grund vorhanden, unseren Nährböden Glutathion wie Tryptophan zuzusetzen.

Da wir in diesem letzten Versuch den für die Milchsäurestäbchen noch notwendigen Aktivator weder im Alkoholniederschlag noch im Filtrate davon fanden, lag nur noch eine Möglichkeit vor, nämlich daß er mit der kleinen Menge Milchzucker, welche vor dem Alkoholzusatz auskristallisierte, entfernt worden war. Wir engten deshalb wieder enteiweißte Molke auf ein Fünftel ein, diesmal jedoch, da wir nicht das Filtrat verwenden wollten, ohne sie vorher mit aktiver Kohle zu behandeln. Von dem in der Kälte auskristallisierten unreinen Milchzucker setzten wir 5% der synthetischen Lösung der Thermobakterien wie derjenigen der Streptobakterien zu. Dieser Zusatz wird mit X bezeichnet. — Allen Substraten wurde wie gewöhnlich Bios und Laktoflavin zugesetzt. Die Röhrchen der Thermobakterien wurden nach 5 und die Röhrchen der Streptobakterien nach 6 Tagen titriert.

Tabelle 19.

Nährsubstrat	Bakterienart				
	Tbm. lactis 9	Tbm. lactis 10	Tbm. bulgaricum 14	Tbm. helveticum 12	Sbm. casei 11
Synthetische Lösung ohne X	5,4	2,5	2,5	3,2	2,5
Synthetische Lösung mit X	17,3	11,7	7,4	13,5	6,8
Molke mit Aminosäuren . .	18,9	15,1	9,5	15,8	8,3

Aus der Tabelle 19 ersieht man die Wirkung des zugesetzten unreinen Milchzuckers, und es ist nicht zu bezweifeln, daß der den Milchsäurestäbchen noch fehlende Aktivator darin vorhanden ist. Durch den Zusatz von X

haben wir fast ebensoviel Säure in den synthetischen Lösungen wie in Molke mit Aminosäuren erhalten. Nur etwas mehr des Milchzuckers und wir hätten wahrscheinlich das Ziel voll erreicht. Wir sind deshalb berechtigt anzunehmen, daß die Milchsäurestäbchen außer Milchbios und Laktoflavin noch einen — wahrscheinlich stickstofffreien — Aktivator benötigen. Es muß hinzugefügt werden, daß wenn die Molke so stark eingeengt wird, bis aller Milchzucker auskristallisiert, derselbe weniger aktiv wird. Die aktivierenden Stoffe werden demnach mit dem erstauskristallisierenden Milchzucker ausgeschieden.

Zusammenfassung.

1. In so weit enteiweißter Säuremolke, wie dies ohne Verwendung besonderer Eiweißfällungsmittel möglich ist, besitzt man eine Flüssigkeit, welche noch sämtliche für die Milchsäurebakterien der Milch nötigen Aktivatoren enthält, die aber eine äußerst schlechte Stickstoffquelle darstellt, und deshalb zum Nachweis der für die Milchsäurebakterien nötigen N-haltigen Stoffe geeignet ist. Die in dieser Weise gewonnenen Ergebnisse müssen jedoch durch Versuche in rein synthetischen Nährlösungen bestätigt werden.

2. Die Milchsäurebakterien der Milch können, obwohl sie keine proteolytischen Enzyme ausscheiden, kolloidale Kaseinate ebenso gut ausnützen wie Peptone, und wenn diese Bakterien so viel besser in Milch als in Molke gedeihen, so rührt das lediglich von den Kaseinaten her. Milchsäurebakterien, welche dieselben nicht ausnützen können, sind nicht, auch nicht, wenn sie Milchzucker vergären können, imstande Milch zu säuern. Das Laktalbumin scheint ohne Bedeutung für die Ernährung der Milchsäurebakterien zu sein.

3. Die Thermobakterien beanspruchen wie die anderen Milchsäurebakterien nicht Tryptophan, sie stellen sonst ebenso hohe oder sogar höhere Ansprüche als die höheren Tiere an ihre Stickstoffnahrung, denn außer Cysteïn, Tyrosin (oder Phenylalanin), Lysin und Histidin, möchte ihnen noch Arginin, Glutaminsäure, Asparagin und Kreatin geboten werden. Ein Zusatz von Glutathion kann nützlich wirken, bisweilen aber auch sehr schädlich, was wahrscheinlich mit der Beeinflussung des Redoxpotentials in Zusammenhang steht.

4. Die Streptobakterien gedeihen mit Ammoniaksalzen und Cysteïn als alleinigen Stickstoffquellen; Kreatin, Diketopiperazin und vielleicht auch Glutaminsäure können jedoch nützlich sein. Sbm. plantarum, aber nicht Sbm. casei, gedeiht besser mit einem Zusatz von Histidin und Lysin.

5. Die Streptokokken gedeihen mit Ammoniaksalzen allein, man sollte ihnen am besten jedoch noch etwas Histidin und Leucin bieten. Kreatin und Hefenucleinsäure wirken günstig.

6. In der Arbeit über den Vitaminbedarf der Milchsäurebakterien wurde gezeigt, daß die echten Milchsäurebakterien alle Milchbios und Laktoflavin benötigen, nur beanspruchen die Stäbchen bedeutend mehr Laktoflavin als die Streptokokken. Dies ist in der vorliegenden Arbeit bestätigt worden, und wir haben ferner gezeigt, daß die Milchsäurestäbchen außer den zwei genannten an aktive Kohle adsorbierenden Aktivatoren, noch einen Aktivator benötigen, der mit dem Milchzucker aus der Molke gewonnen werden kann.

Referate.

Morphologie, Physiologie und Systematik der Mikroorganismen; Virusuntersuchungen.

Novogrudsky, D., and Kononenko, E., On the main forms of Bac. mycoides Flügge and their mutual relations. (Microbiology. Vol. 4. 1935. p. 4—23.) [Russ. m. engl. Zusfassg.]

Aus zahlreichen verschiedensten russischen Böden wurden insgesamt 27 Stämme von Bac. mycoides isoliert, bei deren Untersuchung sich ergab, daß sie zu 3 morphologisch und physiologisch verschiedenen Gruppen gehörten. Die Zelldicke der Gruppe a beträgt 0,84—0,91 μ, die der Gruppe b 1,05—1,12 μ und die der Gruppe c 1,40—1,47 μ. Zwischen diesen Größen gibt es keine Übergänge. Dagegen besteht zwischen a und b und b und c die gleiche zahlenmäßige Beziehung, und zwar gilt für die Zelldicken $a\sqrt[3]{2} = b$ und $b\sqrt[3]{2} = c$, so daß hieraus geschlossen werden kann, daß die Zellvolumina der folgenden Gruppe ungefähr doppelt so groß sind wie diejenigen der vorhergehenden. Die am meisten verbreitete Form ist die mittlere, b, in die sich die beiden anderen bei fortgesetzter Laboratoriumskultur allmählich zurückverwandeln. Dabei nehmen sie nicht nur die morphologischen, sondern auch die physiologischen Eigenschaften der b-Form an. In der Natur kommen alle 3 Formen immer nebeneinander vor. Die einfachen zahlenmäßigen Beziehungen zwischen den 3 verschiedenen Zellformen führen Verf. zur Annahme, daß entsprechend der Theorie von Uspensky a, b und c Entwicklungsformen einer Art sind, die nach bis jetzt unbekannten Gesetzmäßigkeiten ineinander übergehen. Das Bestehen ähnlicher regelmäßiger Beziehungen zwischen Zellgröße und physiologischen Eigenschaften verschiedener Entwicklungsformen anderer Arten hält Verf. für wahrscheinlich. Leider wird nichts darüber gesagt, ob die erwähnten Formen a, b und c zu den bekannten R und S in irgendeiner Beziehung stehen.

Bortels (Berlin-Dahlem).

Besta, B., Untersuchungen über die „Dissoziation" von Tuberkelbazillen. (Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. 117. 1935. S. 403—425.)

Die Aufspaltung von Tuberkelbakterien-Kulturen des bovinen und humanen Typus in die 2 Hauptvarianten S und R gelingt in vitro wie in vivo verhältnismäßig leicht. Versuche, Kulturen von Gallinaceus-Stämmen aufzuspalten, verliefen öfter negativ. Die äußeren, diese Variation mitbestimmenden Ursachen waren nicht eindeutig feststellbar; die Aufspaltungsvorgänge waren sprunghaft und entzogen sich jeder Vorausberechnung. Tiefgreifende biologische Unterschiede zwischen den R- und S-Varianten waren nicht nachweisbar, in den hochvirulenten Kulturen der 3 Typen waren die R- und S-Varianten stets von der gleichen hohen, in abgeschwächten Kulturen von der gleichen geringen Virulenz. Die Variationserscheinungen in Tuberkelbakterienkulturen sind demnach nicht analog den von Arkwright de Kruif, Griffith beobachteten Variationsvorgängen, die in der Abspaltung von avirulenten Rauhformen bestehen.

Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Kristensen, M. und Kaufmann, F., Untersuchungen über einen indolpositiven Salmonella-Stamm. (Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. 117. 1935. S. 426—430.)

Bisher erschien es berechtigt, die Forderung der fehlenden Indolbildung

in die Definition der Salmonella-Gruppe aufzunehmen. Diese Forderung kann indes nicht mehr aufrechterhalten werden; denn bei dem Stamm Eastbourne, der serologisch wie auch vergärungsmäßig unbedingt zur Salmonella-Gruppe gehört, wurde Indolbildung nachgewiesen. Neben indolpositiven Individuen wurden aber auch indolnegative beobachtet. Es gelang außerdem, gaslose Varianten — sowohl in Normalform als auch in Zwergform — zu isolieren. Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Dahr, P. und Kolb, H., Schleimige Bakterienwuchsform als Krankheitserreger. (Dtsch. med. Wochenschr. Jahrg. 61. 1935. S. 1879—1881.)

Bei einer ungewöhnlichen Form von Pyocyaneus-Infektion (Pyelonephrose) wurden aus dem Urin und dem bei der Operation gewonnenen Eiter stark schleimigwachsende Pyocyaneus-Bakterien in Reinkultur gezüchtet. Über das Vorkommen von schleimig wachsendem Bact. pyocyaneum ist bisher nur einmal berichtet worden (Sonnenschein, 1927).

Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Winkler, K., Serologische Untersuchungen über einen Gelbkeimstamm. (Ztschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therapie. Bd. 86. 1935. S. 156—161.)

Die Untersuchungen eines Gelbkeimstammes, der von Seren der Salmonella-Gruppe agglutiniert wurde, ergab, daß der Stamm keines der Hauptantigene der Salmonella-Gruppe besaß. Die Agglutination wurde vielmehr hervorgerufen durch Nebenagglutinine, die zwar Beziehungen besaßen zu denen innerhalb der Salmonella-Gruppe, aber nicht mit diesen identisch waren. Der Besitz eines solchen Nebenagglutinins gestattet natürlich keinerlei Rückschlüsse auf genetische Beziehungen des untersuchten Stammes zur Salmonella-Gruppe. Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Roberg, M., Beiträge zur Biologie von Azotobakter. II. Der Stickstoffgehalt der Filtrate von Azotobakterkulturen. (Jahrb. f. wiss. Bot. Bd. 82. 1935. Heft 1. S. 65—98.)

Azotobakterkulturen bewirken eine Zunahme der in der Nährlösung vorhandenen, gelösten Stickstoffverbindungen. Steht kohlenstoffhaltige Nahrung zur Verfügung, so bilden sich lediglich ammoniakfreie Stickstoffverbindungen, ist jedoch die Kohlenstoffquelle verbraucht, so läßt sich Ammoniak nachweisen. Die Stickstoffverbindungen werden sowohl durch Diffusion abgegeben als auch durch Dissimilationsprozesse, die nach Verbrauch der Energiequellen in besonders starkem Maß auftreten. Das Eiweiß toter Azotobakterzellen wird zum größten Teil durch autolytische Vorgänge in lösliche Form übergeführt. Die untersuchten Azotobakterarten, Azotobacter chroococcum, A. agile und A. Beijerinckii, zeigten nur in der Quantität der abgegebenen, löslichen Stickstoffverbindungen Unterschiede. Wie der von Azotobakter gebundene Stickstoff weiter verwertet wird, ist durch ein Schema zum Ausdruck gebracht. Die Bestimmung der Stickstoffmengen wurde mit Hilfe eines näher beschriebenen Mikro-Kjeldahl-Gerätes aus Quarz vorgenommen. Bärner (Berlin-Dahlem).

Dumesh, M. G., On the halophily and salt tolerance of bacteria. (Microbiology. Vol. 4. 1935. p. 45—56.) [Russ. m. engl. Zusfassg.]

Die Wirkung isotonischer Lösungen verschiedener Salze auf Bakterien ist nicht die gleiche. Sie hängt von der Giftigkeit der Ionen einerseits und der Widerstandsfähigkeit des jeweiligen Bakteriums anderseits ab. Während die diesbezügliche Ionenreihe für Protozoen K > Na > Li > Mg > Ba > Ca ist, gilt für Bakterien allgemein Ca > NH_4 > Li > Mg > K > Na. Unter dem Einfluß hoher Salzkonzentrationen konnten tiefgreifende Veränderungen an den Bakterienkulturen beobachtet werden, die zur Entstehung verschiedener Varianten, ja sogar neuer Arten geführt haben sollen. Deshalb hat die Widerstandsfähigkeit, z. B. der Typhus-Paratyphus-Gruppe, gegenüber hohen Kochsalzkonzentrationen nicht nur ein theoretisches, sondern auch ein epidemiologisches Interesse. Bortels (Berlin-Dahlem).

Mossewitsch, M., Studium von Mikroorganismen, die widerstandsfähig gegen Alkali sind. (Microbiology. Vol. 4. 1935. p. 240—246.) [Russisch.]

Während der Bearbeitung von Lederabfällen und Knochen (in der Leim- und Gelatineindustrie) mit Kalk, entwickelt sich in den Gefäßen eine bestimmte Mikroflora, ohne daß irgendwelche Infektion von außen stattgefunden hätte. Vorherrschend sind Bakterien, die sich vornehmlich auf alkalischen Nährböden entwickeln. Typische Vertreter dieser Mikroflora waren vor allem drei sporentragende Bakterien, die Bac. teres, B. circulans und B. tumescens am nächsten stehen und sich von denselben durch einige physiologische Merkmale unterscheiden. Für die Entwicklung dieser Mikroorganismen ist p_H 8,0—9,0 am günstigsten, sie entwickeln sich jedoch auch bei p_H 11,5 gut. Die Widerstandsfähigkeit der Sporen gegen Alkali ist sehr hoch, z. B. sind 1½ Monate in 2,5 proz. NaOH-Lösung gelegene Sporen keimungsfähig. In 20 proz. NaOH-Lösung bleibt die Lebensfähigkeit der Sporen noch 48 Std. erhalten. Die Bakterien sind gegen antiseptische Mittel widerstandsfähig: 4 proz. Xylol-, Toluol- und Chloroformlösungen hindern nicht das Wachstum und die Fähigkeit, Gelatine zu verflüssigen. A. Imšenecki (Moskau).

Hecht, E., Zur Frage des Steringehaltes von Bakterien, insbesondere des Tuberkelbacillus, zugleich ein methodischer Beitrag zum Nachweis des Cholesterins. (Ztschr. f. physiol. Chem. Bd. 231. 1935. S. 29—38.)

Bisher haben zahlreiche Forscher vergeblich versucht, Sterine in Bakterien nachzuweisen. Besonders die säurefesten Tuberkelbacillen sind in den letzten Jahren vielfach Gegenstand diesbezüglicher Untersuchungen gewesen. Diese Befunde waren insofern sehr merkwürdig, als Sterine sonst überall im Tier- und Pflanzenreich und auch in zahlreichen Pilzen gefunden wurden. Verf. konnte in vorliegender Arbeit zeigen, daß mit Hilfe besonderer Extraktionsverfahren Sterine aus Tuberkelbacillen in kleinen Mengen gewonnen werden können, die sich mit Hilfe der Digitoninfällung und den bekannten Farbreaktionen nachweisen lassen. R. Koch (Berlin).

Sembrat, Z., O wplywie kofeiny na zmiany morfologiczne bakteryj brodawkowych. (Influence de la coféine sur les modifications des bactéries nodulaires.) (Act. Soc. Bot. Pol. Vol. 11. 1934. p. 333—346.)

Die drei zur Untersuchung gelangenden Rassen von Knöllchenbakterien

stammten von der Lupine, dem Klee und der Erbse. In Bouillonkultur mit Coffeinzusatz verhielten sie sich nicht gleichartig. Die Bakterien der Lupine blieben sehr klein, ebenso wie die sich viel später als normal entwickelnden Bakteroiden. Diese verschwanden meist wieder schnell, ausdauernd waren nur die Formen mit der für Bact. radicic. charakteristischen Vakuole. Die Wasserstoffionenkonzentration übte auf die einzelnen Rassen einen verschiedenen Einfluß aus. Solche üppigen Formen wie sie beim Erbsen- und Kleestamm auftraten, konnten bei dem Lupinenstamm nicht beobachtet werden. Die Bakteroiden der Erbse erschienen zuerst in Form großer Fäden, ungleichfarbig. Nach ihrem Verschwinden wurden sie durch zahlreiche, mit Vakuolen versehene ovale Bakterien ersetzt. Die größte Mannigfaltigkeit traf Verf. beim Klee an, kugelförmig, sternförmig, gedreht usw. In der 2. Woche verschwanden auch hier die Bakteroiden, um durch kleinere ersetzt zu werden, die während der ganzen Versuchsdauer erhalten blieben. Einzelne Zellen zeigten Körner, die Verf. als gonidienähnliche Formen betrachtet. Im Anfangsstadium sahen die Rassen von Erbse und Klee ziemlich gleich aus, einfach bazillenförmig, schwach farbig. In morphologischer Hinsicht verhielten sich alle 3 Stämme von der 2. Woche ab gleichartig, an Stelle der verschwindenden Bakteroiden traten körnige Massen, oder sehr kleine kokkenähnliche Bazillen auf.

Skallau (Berlin).

Wezesol, A., Verzuckerung der Kartoffelstärke durch Bakterien und Symbiose der letzteren mit Hefe. (Gärindustrie. Ar. 1. 1931. S. 17—22.) [Russisch.]

Aus „mongolischen Ziegeln" — gepreßte grobgemahlene Getreidemasse — wurden 2 Bakterienstämme isoliert. Der eine Stamm gehörte zur Gruppe des B. subtilis, der andere hatte viel Ähnlichkeit mit B. mesentericus.

Die beiden isolierten Bakterienarten, wie auch dem Museum entnommene Stämme von B. subtilis und B. mesentericus riefen Hydrolyse der Stärke hervor, unter Bildung von Maltose, Achrodextrin und geringer Menge Glukose. Das Temperaturoptimum der Verzuckerung der Kartoffelstärke liegt zwischen 37 und 40° C. Schwach saure bis neutrale Reaktion (p_H 6,0—6,8) ist für den Prozeß am günstigsten. Durchlüftung des Nährbodens beschleunigt die Hydrolyse bedeutend. Zusatz von Pepton (0,5—1%) zur Stärke beschleunigt die Hydrolyse und hebt den Zuckerertrag um 40—45%. Die Beobachtung der Symbiose von Bakterien und Hefe führte zum Schluß, daß es zweckmäßiger ist, vorher die Stärke bei 35—38° C. zu hydrolisieren und erst dann Hefe hinzuzufügen und bei 37—30° C gären zu lassen. Die besten Ergebnisse lieferte B. mesentericus: der Alkoholertrag betrug 7%, 23% des theoretischen Ertrages. Zur Gärung wurden S. cerevisiae Rasse XII, S. Logos und Schizosaccharomyces Pombe verwandt. Während des Gärungsprozesses üben die Symbionten keinen schädlichen Einfluß aufeinander aus. Nach der Vergärung greifen die Bakterien das Protoplasma der Hefezellen (Protease) an und erhöhen im Nährboden den Gehalt an gelöstem Stickstoff.

A. Imšenecki (Moskau).

Stockhausen, F. und Silbereisen, K., Hefegummistudien II. Über den Hefegummigehalt und seine Bedeutung in der Hefe. (Wochenschr. f. Brauerei. Bd. 52. 1935. S. 257—259.)

Es sollte versucht werden, mit Hilfe einer exakten Analysenmethode ein Bild über die Beziehungen zwischen Heferasse (Bruch- und Staubhefe, hoch- und niedrigvergärende Hefe) und ihrem Gehalt an Hefegummi bzw. Glykogen zu gewinnen und so unsere Kenntnisse über die Bedeutung der Kohlehydrate der Hefe zu erweitern. Die Untersuchung von Brauerei-, Wein- und Bäckerhefen ergab keine regelmäßigen Beziehungen zwischen der Höhe der Vergärung und dem Gehalt an Hefegummi. Man stellte nur fest, daß der Hefegummigehalt bei Brauereihefen zwischen 4 und 6%, bei

Weinhefen zwischen 7,5—8,5% sich bewegt, während er bei Bäckerhefen noch höhere Werte erreicht. Der Gehalt an Gummi und Glykogen in der Hefe scheint in umgekehrtem Verhältnis zu stehen. Bei der Untersuchung einer in Gärung befindlichen Hefe fand man in dem zuerst flockenden Anteil weniger Hefegummi als in der zuletzt erhaltenen Bodensatzhefe; dies hängt mit der Neubildung von Zellen in den Anfangsstadien der Gärung zusammen. Im Gegensatz zum Glykogen ist der Hefegummi nicht als Reservekohlehydrat anzusprechen, denn er nimmt während der Selbstgärung der Hefe nicht ab, sondern erfährt eine Zunahme. Heuß (Berlin).

Schäfer, G., Beiträge zur Kenntnis der Ernährung der Hefe beim Lufthefeverfahren. Dresden (Risse-Verlag) 1933. 47 S.

Verf. berichtet über eine Reihe von Versuchen zur Prüfung verschiedener Stickstoff- und Phosphorverbindungen auf ihre Eignung zur Ernährung einer im Lufthefeverfahren gewonnenen Preßhefe. Da man in der Broschüre vergeblich nach irgendeiner neuen, für den wissenschaftlichen oder technischen Fortschritt bedeutungsvollen Erkenntnis sucht, muß man sich fragen, warum diese Arbeit überhaupt durchgeführt worden ist und warum sie gedruckt wurde. Wenn Verf. behauptet, daß man bis vor kurzem nichts von der Anwesenheit der Invertase in der Hefe wußte und erst Willstätter nachwies, daß die Hefe die Spaltung des Rohrzuckers in Glukose und Fruktose selbst ausführt, so kennzeichnet dies die vorliegende Arbeit zur Genüge. Sie kann leider nur als wertlos bezeichnet werden. R. Koch (Berlin).

Kögl, F. und Kostermans, D. G. F. R., Hetero-auxin als Stoffwechselprodukt niederer pflanzlicher Organismen. Isolierung aus Hefe. (Ztschr. f. physiol. Chem. Bd. 228. 1934. S. 113—121.)

Aus Bäckerhefe wurde ein Wuchsstoff isoliert, der als β-Indolylessigsäure identifiziert werden konnte. Weder Auxin a noch Auxin b waren in der Hefe nachweisbar. Auch in anderen Pilzen (Rhizopus nigricans und Aspergillus niger) konnte nur die β-Indolylessigsäure als einzige Wuchsstoffkomponente nachgewiesen werden. Für die Hefen und Schimmelpilze selbst ist dieses Heteroauxin kein notwendiger Wachstumsfaktor. Die Pilze bringen also ein anderes Auxin hervor als die Gräser. R. Koch (Berlin).

Hatch, W. R., Gametogenesis in Allomyces arbuscula. (Ann. Bot. Vol. 49. 1935. p. 623—649.)

Verf. unterwirft das immer noch unvollständig bekannte geschlechtliche Verhalten dieser Blastocladiacee einer eingehenden Studie. Das undifferenzierte Myzel trägt Zoopsorangien, das geschlechtliche dagegen bildet Gametangien aus. Da jedoch sich diese Myzelien aus einer Zoospore entwickeln und demgemäß alle Kerne sich von dem gleichen Anfangskern ableiten, bestehen keinerlei genetische Unterschiede in der Kernkonstitution während des Gametangienstadiums. Die Verteilung der Kerne ist während der Ausbildung der Gametangien im Hyphenende ziemlich willkürlich und zahlenmäßig gleich. Verf. schließt nun weiter, daß infolgedessen die Geschlechtsbestimmung durch andere Einschlüsse des Zytoplasmas erfolgen müsse. Da für die Lipoidkörner das gleiche gilt wie für die Kerne, bleiben nur noch die Chondriosomen. Sie sind zur Zeit der Ausbildung der Gametangien ungleichmäßig im Hyphenende verteilt, in der Spitze häufen sie sich an, dahinter sind sie weniger zahlreich und weit verstreut. Da die Ausbildung der abgrenzenden Querwände der beiden Gametangien gleichzeitig während dieses Verteilungszustandes von Kernen, Lipoiden und Chondriosomen beginnt, sind vermutlich die letzten für die Geschlechtsbestimmung verant-

wortlich zu machen. — Das weibliche Gametangium ist endständig, besitzt im Reifestadium mehrere Ausbuchtungen, ist rundlich, sein Inhalt ist mattgrau. Die Reifung des subterminalen, walzenförmigen, männlichen Gametangiums ist durch einen auffälligen Farbwechsel gekennzeichnet. Das Zytoplasma ist anfänglich grauschwarz. Bei der Ausbildung der eigentümlichen seitlichen Ausbuchtungen und den Einschnürungen an den Querwänden wird das Plasma heller, gelblich. Im reifen Zustand ist es rostfarben. Erscheinen dann die Papillen auf beiden Gametangien, so geht die Farbe in lachsrosa über. Bis dahin ist die Farbe des weiblichen Gametangiums gleich geblieben. Werden dann die Gameten entlassen, so geht bei beiden die Farbe in einen messingähnlichen bzw. graugelblichen Ton über. Das Verhalten der Lipoidkörner und Chondriosomen ähnelt demjenigen von Leptomitus und Saprolegnia. Verf. unterscheidet in der Entwicklung der Gametangien diese Stadien, die im einzelnen beschrieben werden: granular, gamete origin, disappearance und cleavage stage. Im lebenden Zytoplasma führen die Lipoidkörner Bewegungen aus, die der Brown schen Molekularbewegung ähneln, die Chondriosomen sind sehr träge. Die Kerne des männlichen Gametangiums teilen sich zweimal so schnell wie die des weiblichen Partners, sind infolgedessen nur halb so groß wie diese. Sämtliche Kerne besitzen jedoch immer 6 Chromosomen. Der Kern bildet jedesmal den Ausgangspunkt für die Bildung eines Gameten. Um ihn gruppieren sich die Chondriosomen, die sich während der Reifung zu einer Kernkappe zusammenschließen. Um diese legt sich ein Ring von Lipoidkörnern, dann das Plasma, das schließlich von einer Membran umgeben wird. Aus dem Nukleolus entspringt eine Geißel. Die Gameten bewegen sich um ihre Achse und amöboid. Es bestehen Analogien zwischen der Kernkappe und der Limosphäre von Spermatozoiden bei Moosen, ebenso vielleicht in der Entwicklung des Nebenkernes der Spermatozoiden gewisser Dipteren.

Skallau (Berlin).

Matsuura, H., and Gondô, A., A Karyological Study on Peziza subumbrina Boud., with Special Reference to a Heteromorphic Pair of Chromosomes. (J. Fac. Sci. Hokk. Imp. Univ. Ser. V. Bot. Vol. 3. 1934/35. p. 205—217.)

Die Bildung des Askus beginnt mit dem Einwandern zweier Kerne in die askogene Hyphe, die sich am Ende hakenförmig umbiegt. Beide Kerne teilen sich gleichzeitig, in der Metaphase kann man in jedem Kern 4 Chromosomen beobachten. In einem Kern fällt ein breites, Kurzstäbchen-förmiges Chromosom auf neben den übrigen kleinen, ovalgestalteten. In der Anaphase sind 8 zählbar. Bei Vollendung der ersten Teilung liegen eine endständige, einkernige und eine zweikernige Zelle vor. In dieser letzten findet dann die Kernverschmelzung zum primären Askuskern statt. Die Ausbildung der 8 Sporen ist durch drei Teilungsstadien charakterisiert: eine Reduktionsteilung und zwei Äquationsteilungen, deren Reihenfolge nicht immer gleich zu sein scheint. Das Vorkommen eines heteromorphen Chromosomenpaares (ein breites Kurzstäbchen und ein kleines, kugeliges Gen) ist für die Reduktionsteilung und die Abspaltung der Gene für die Heterothallie der Askomyzeten von besonderer Bedeutung. Die Reduktionsteilung tritt nur einmal auf, und zwar meist zuerst, dann folgen die beiden homöotypischen Teilungen. Das ist deutlich an dem Verhalten des heteromorphen Paares zu verfolgen. Sehr selten tritt die Äquationsteilung zuerst auf. Zweimalige Kernverschmelzungen scheinen nicht vorzukommen. Aus dem Verhalten des auffälligen Geminus bei der Kernverschmelzung in den askogenen Hyphen und bei der Meiosis schließen Verff., daß es sich um Geschlechtschromosomen handelt. Brachymeiosis ist nicht vorhanden, in der Haploidphase gibt es 4 Chromosomen.

Skallau (Berlin).

Carter, J. C., Diffusible nature of the inhibitory agent produced by fungi. (Phytop. Vol. 25. 1935. p. 1031—1034.)

Helminthosporium sativum wuchs nicht weiter, wenn auf den Nährboden alter Agar gebracht wurde, auf dem Helminthosporium sativum und ein Bakterium 9 a 2 gewachsen war. Der Stoff, der das Wachstum verhindert, ist wärmebeständig, diffundiert vom Agar in Wasser und behält seine Eigenschaften auch nach der Sterilisation.

Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Mikrobiologie der Nahrungs-, Genuß- und Futtermittel.

Kraewskaja, A., Zur Methodik der B. Coli-Bestimmung bei Kontrolle der Milchindustrie. (Microbiology. Vol. 4. 1935. p. 73—80.) [Russisch.]

Bact. coli in der Milch sollte innerhalb von 24 Std. bestimmt werden. Da die antiseptische Wirkung der Galle auf B. aerogenes stärker ist, als auf B. Coli, empfiehlt Verf. folgenden Nährboden. Durch Watte filtrierte und sterilisierte Galle wird mit 1% Pepton und 1% Laktose versetzt. Die Mischung wird in 10 Min. bis 100° erhitzt und darauf 8 ccm 1 proz. wässerige Gentianaviolettlösung auf 1 l Nährboden hinzugefügt. Mittels dieses Nährbodens läßt sich der Colititer der Milch in 20—22 Std. feststellen. Die besäten Kulturröhrchen sind während der Untersuchung bei 41° aufzubewahren. Wird diesem Nährboden 1% Agar-Agar zugefügt, so läßt sich ein fester Nährboden gewinnen, der sich für Laboratorien eignet, die von Schlachthäusern entfernt sind. In diesem Fall wird geschmolzener Agarnährboden besät. Bei der Entwicklung des B. coli wird der Nährboden gesprengt. A. Imšenecki (Moskau).

Downs, P. A., Hammer, B. W., Cordes and Macy, W. A., Bacteriological methods for the analysis of dairy products. (Journ. of Dairy Sci. Vol. 18. 1935. p. 647—656.)

Als Ergänzung zu den schon früher vom Komitee der American Dairy Science Association herausgebrachten Laboratoriumsuntersuchungs-Methoden für Molkerei-Erzeugnisse werden hier im besonderen die bakteriologischen Verfahren zur Untersuchung von Kondensmilch-Arten behandelt.

Der 1. Teil befaßt sich mit der evaporierten Milch (sterilisiert). Für die Keimzählung wird die Standard-Agar-Plattenmethode vorgeschlagen. Zur Verdünnung benutzt man am besten die volumetrische Methode, indem man von dem gut durchmischten Material 10 ccm zu 90 ccm Wasser gibt. Bei verdorbenen Proben (koagulierten) empfiehlt sich als Verdünnungsmittel N/10 LiOH. Zweckmäßigerweise soll auch ein Teil der Platten unter Zufügung von 1% Glukose nach anaeroben Gesichtspunkten bebrütet werden. Die Sterilitätsprobe besteht darin, daß man die Dosen eine Woche lang bei 37° C hält. Im Anschluß daran wird der Inhalt nach der Standard-Plattenmethode untersucht. Die direkte mikroskopische Untersuchung nach Breed ist nur bei verdorbenen Erzeugnissen von Wert und zwar in der von Fay für Rahmeis angegebenen Art und Weise (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 89. 1934/35. S. 422). Für die Untersuchung auf thermophile Bakterien ist ein besonderer Agar angegeben. Zur Prüfung auf Sporenbildner muß die evaporierte Milch vor dem Verarbeiten auf die Agarplatten 10 Min. auf 80° C erhitzt werden.

Im 2. Teil wird die bakteriologische Untersuchung von kondensierter Milch (unvollständig sterilisiert) behandelt. Unter Kondensmilch wird hier solche verstanden, die nicht im endgültigen Behälter sterilisiert worden ist, gleichgültig ob nun Zucker zugefügt wurde oder nicht. Bei der Probenahme der gesüßten Milch ist besonders darauf zu achten, daß man vorher die Zähflüssigkeit durch Erhitzung auf 37,5° für eine kurze Zeit beseitigen muß. Dickere, gesüßte Milchen müssen eingewogen werden. In ganz abnormen Fällen ist es sogar notwendig, die Verdünnung der dicken Kondensmilch in der Verdünnungsflasche mit Hilfe von Glassplittern oder Glasperlen zu bewerkstelligen. Die Verwendung von N/10 LiOH erleichtert diese Prozedur wesentlich. Die direkte mikroskopische Keimzählung läßt sich hier besser anwenden als bei der evaporierten Milch. Die Prüfung auf hämolytische Streptokokken soll in Kalbfleischbouillon-Blutagar vorgenommen werden. Die Untersuchung auf thermophile Bakterien ist dieselbe wie oben. Auf das Vorhandensein von Bakterien, die das Dickwerden verursachen, prüft man in folgender Weise: Die fragliche Milch wird in sterilem Wasser in einer mit Glasstopfen versehenen Flasche so weit verdünnt, daß die Konzentration

des Zuckers in dem Gemisch ungefähr 40% beträgt (normalerweise 90 g Milch zu 10 g Wasser). Nach gründlichem Durchschütteln wird das ganze während eines Monats bei 30° C bebrütet. Sind solche Organismen vorhanden, wird die Milch unter wesentlichem Ansteigen der titrierbaren Azidität dick. Sie lassen sich dann leicht durch die Agarplatten-Methode nachweisen. Zur Prüfung auf Gasbildner eignet sich der weiter oben für thermophile Bakterien angegebene Nähragar, indem man eine Schüttelkultur in hoher Schicht anlegt. Zur Prüfung auf Hefen, die Bombage verursachen, ist es gut, die Dosen für längere Zeit bei 37° zu bebrüten. Im positiven Falle wird vom Inhalt auf Standard-Nähragar übertragen, dem vor der Sterilisation 30% Rohrzucker zugefügt worden ist. Will man schon unmittelbar nach der Fabrikation auf das Vorhandensein von solchen Organismen prüfen, ist es zweckmäßig, sie vorher 2 Tage lang bei 37° C in 30 proz. Rohrzucker-Bouillon anzureichern. Die allgemeine Bestimmung der Pilz- und Hefe-Keimzahl, wie sie bei der Butteranalyse üblich ist, kann wertvolle Aufschlüsse darüber geben, wie die hygienischen Bedingungen bei Herstellung der kondensierten Milch gewesen sind.

Die Resultate sollen auf 1 ccm bzw. 1 g des Erzeugnisses bezogen werden.

K. J. Demeter (München-Weihenstephan).

Sherman, J. M., and Wing, H. U., An unnoted hemolytic streptococcus associated with milk products. (Journ. of Dairy Sci. Vol. 18. 1935. p. 657—660.)

Der untersuchte Streptococcus wurde wiederholt (40 Kulturen) aus den Erzeugnissen ein und derselben Molkerei isoliert. Seine hämolytische Eigenschaft (sog. Beta-Typ) hat er während 5 jähriger Laboratoriumskultur nicht verloren. Lackmus-Milch wird koaguliert, unter schwacher nachträglicher Reduktion des Lackmus-Farbstoffes. Sein Wachstum tritt bereits bei 10° C ein, was bei den pathogenen Typen der hämolytischen Streptokokken nicht der Fall ist. Andererseits wird bei diesen das Maximum von 45° nicht überschritten, während die vorliegende Art das Maximum bei 50° C besitzt. Die Stämme erwiesen sich des weiteren als sehr hitzeresistent, indem alle Kulturen eine 30 Min. dauernde Erhitzung auf 62,8° C überlebten, die Mehrzahl sogar auch eine Temperatur von 65,6° C! Beachtenswert ist weiterhin die Fähigkeit, in Glukose-Bouillon die p_H-Werte auf 4,4—4,0 herabzudrücken. Saccharose wird nicht abgebaut, was nach der Literatur bei allen Beta-hämolytischen Streptokokken der Fall ist, dagegen wird Natriumhippurat unter Bildung von Benzoesäure und Glycokoll gespalten. Pathogenität für Mäuse, Meerschweinchen und Kaninchen besteht nicht. Infolge dieser Besonderheiten, die die gefundenen Stämme vor allen anderen Streptokokken auszeichnen, wurde dieser Streptococcus mit dem Namen Streptococcus hemothermophilus als eigene Art aufgestellt.

K. J. Demeter (München-Weihenstephan).

Ramsdell, Guy A., Johnson, Wm. T. jr., and Evans, F. R., Investigation of resazurin as an indicator of the sanitary condition of milk. (Journ. of Dairy Sci. Vol. 18. 1935. p. 704—717.)

Auf 10 ccm Milch gibt man 0,1 ccm der 0,5 proz. Resazurinlösung, das entspricht einer endgültigen Konzentration von 1 : 200 000. Die Bebrütung erfolgt gegen Licht geschützt bei 37° C. Nach 1 stünd. Bebrütung wird dann an Hand einer Farbtafel mit 10 Abstufungen, die zusammen mit den Zwischenwerten insgesamt 19 Farbtöne zu unterscheiden gestattet, der Grad der Reduktion festgestellt. Farbwert 19 ist völlig rosarot. Zur Einteilung in verschiedene Klassen wurde folgendes Schema aufgestellt:

I =	gute Milch,	Farbwerte 1— 6,
II =	Durchschnittsmilch,	„ 7—18,
III =	schlechte Milch,	rosa, jedoch nicht entfärbt,
IV =	sehr schlechte Milch,	völlig entfärbt.

Wenn man die Proben wieder ins Wasserbad zurückstellt und weiterhin stündlich kontrolliert, bekommt man ein genaueres Bild von der hygienischen Qualität der einzelnen Milchen, das durch eine gleichzeitig durchgeführte mikroskopische Analyse sehr vervollkommnet wird; denn es zeigt sich dann, ob z. B. eine langsame Reduktion tat-

sächlich auf eine geringe Keimzahl zurückzuführen ist oder aber nur auf einen Mangel an stark reduzierenden Bakterien, desgleichen ob bei rascher Reduktion hohe Keimzahlen oder pathologische Zustände vorliegen (hoher Zellgehalt). Im übrigen kann, wie bei der zum Vergleich herangezogenen Methylenblauprobe, eine engere Korrelation zwischen Keimzahlen und Entfärbungs- bzw. Umschlagszeiten nicht erwartet werden.

K. J. Demeter (München-Weihenstephan).

Holmquist, C. A., Tisdale, E. S., Irwin, R. E., Frank, L. C., and Whittaker, H. A., Milk Supply. (Amer. Publ. Health Assoc. Year Book 1934/35. p. 160—165.)

Es wurde in verschiedenen Gegenden der Vereinigten Staaten die Einwirkung handelsublicher Flaschenwasch-Methoden untersucht, ohne daß Chlorpräparate bei der endgültigen Spülung verwendet wurden. Hierbei kamen folgende Waschmethoden zur Prüfung: a) Einweichapparat ohne Bürsten; b) Einweichapparat mit Bürsten; c) Flaschenwaschmaschine in Kastenform; d) Handwaschmaschine mit maschineller Bürstvorrichtung; e) Handwaschmaschine mit manueller Bürstenreinigung. Beim Beginn der Waschversuche wurde zunächst nur die Hälfte des Waschmittels verwendet und dann der Apparat mit der ersten Flaschenserie in Betrieb gesetzt. Hierauf wurde die zweite Hälfte des Waschmittels zugefügt und der Apparat mit der zweiten Flaschenserie betrieben. Die unbehandelten Kontrollen waren vorher beiseite gestellt worden. Auch wurde das letzte Flaschenspülwasser in den Apparaten vor und nach Betrieb einer bakteriologischen Untersuchung unterzogen. Die in den verschiedenen Betrieben verwendeten Waschmittel waren in der Hauptsache folgende: Alkali allein, Alkali mit Trinatriumphosphat, Alkali mit Natriummetasilikat. In manchen Fällen bestanden die Waschmittel auch aus Soda, Trinatriumphosphat und Seifenpulver, jedes für sich allein. In einigen Fällen war das Waschmittel auch unbekannter Zusammensetzung. Die höchsten Waschmittelkonzentrationen wurden bei den unter a) und b) genannten Apparaten beobachtet (5,1 bzw. 3,0%). Bei den unter c) genannten Apparaten konnte eine durchschnittliche Konzentration von 1,1% und bei den unter d) und e) genannten Apparaten eine solche von durchschnittlich nur 0,48 bzw. 0,41% festgestellt werden. Weitere Angaben sind über Temperatur und Zeitdauer der Einweichung, die Bürstezeit und die Ausspritzzeit angegeben, desgleichen über die Temperatur des letzten Ausspülwassers. Die erhaltenen Resultate bezüglich Wirksamkeit der Flaschenreinigung auf die Bakterienabtötung wurden mit der Standardforderung des öffentlichen Gesundheitsdienstes verglichen, wonach in einer ordentlich gereinigten Flasche die Infektion nicht größer sein soll, als ein Keim pro Kubikzentimeter Fassungsvermögen. Mit keinem der angewendeten Verfahren wurde diesen Forderungen zu 100% entsprochen. Am wirksamsten erwies sich immerhin die unter c) genannte Apparatur mit nur 10—17% Häufigkeit der Standardüberschreitung, während das unter e) geschilderte Handwaschverfahren am schlechtesten abschnitt mit 38—46% Überschreitung. Die anderen Apparate nahmen eine Mittelstellung ein.

K. J. Demeter (München-Weihenstephan).

Cruess-Callaghan, G., The application of the catalase test to butter. (Sci. Proc. Roy. Dubl. Soc. Vol. 21. p. 253—255. 1935.)

Nach einem Bericht über die vorhandene Literatur gibt Verf. Erklärungen für die abweichenden Werte, die von den verschiedenen Verff. bezüglich indirekter Korrelation der Katalasewerte mit der Qualität und der Haltbarkeit der Butter gefunden worden sind. Es seien weder die niedrigen Korrelationskoeffizienten, die Demeter und Christiansen gefunden haben (— 0,160 bis + 0,191) korrekt, noch die hohen, die Knudsen gefunden hat (— 0,85 bis — 0,96). (Bei idealer direkter Korrelation beträgt der Koeffizient + 1, bei indirekter — 1. D. Ref.). Bei richtiger Auswertung der von Knudsen 1930 angegebenen Zahlen kommt man nach Verf. auf einen Korrelationskoeffizienten von ungefähr — 0,4. Dieser sei als der einzige zuverlässige Index für die Brauchbarkeit der Katalaseprobe zur Qualitäts- bzw. Haltbarkeitsbestimmung der Butter zu bezeichnen.

K. J. Demeter (München-Weihenstephan).

Burkey, L. A., Sanders, G. P., and Matheson, K. J., The bacteriology of swiss cheese. Effect of temperature upon bacterial activity and drainage in the press. (Journ. of Dairy Sci. Vol. 18. 1935. p. 719—731.)

Zu den Untersuchungen wurden Reinkulturen von Strept. thermophilus, jeweils in Verbindung entweder mit Lactobacillus bulgaricus oder L. helveticus verwendet. Die Brenntemperatur war bei allen Käsen einheitlich 53° C.

Ergebnisse: Die Käsepartie unmittelbar unter der Rinde kühlte rascher aus als das Innere. Während im Bereich der Rinde alle als Kultur zugesetzten Bakterien während der ersten Stunden nach Ausheben gleichmäßig zunahmen, ging die Keimvermehrung im Inneren folgendermaßen vor sich: Str. thermophilus setzte mit der Entwicklung schon nach 2—3 Std. ein, L. bulgaricus nach 5—6 Std. und L. helveticus erst nach 9—10 Std. als wesentlichste Funktion des Str. thermophilus unter der Presse ist die Säurebildung und die dadurch herbeigeführte, Beschleunigung des Auslaufens auch des Kaseinneren während der ersten 4—6 Std. nach Ausheben zu betrachten. Wenn daher größere pH-Unterschiede zwischen äußerer und innerer Partie auftreten, dann besteht die Gefahr, daß die Feuchtigkeit im Inneren infolge der fortgeschrittenen Rindenbildung zurückgehalten wird. Die Folge davon ist ein Aufspringen der Järbseite oder zum mindesten ein Gläsler. Die verzögerte Bakterientätigkeit im Innern des Käses schafft des weiteren Bedingungen für das Wachstum gasbildender Keime, die in größerer Zahl einen sog. Preßler verursachen können. Ein späterer Überschuß an Säure im Innern verzögert in den ersten Reifestadien die normale Augenbildung und verursacht schließlich entweder blinde Käse, Gläsler oder Järbseitenrisse. Ist dagegen die Säurebildung und das Auslaufen der Käse schon während der ersten Stunden unter der Presse sehr stark, dann kann die anschließende Säurebildung zu schwach ausfallen und die Folge ist dann ein zu kurzer und krümeliger Teig. Solche Käse haben die Tendenz, zu fruh und zu reichlich anzusetzen (muschelige und unregelmäßige Lochung). Weiterhin ergab sich, daß der Bakteriengehalt des Käsetuches die Geschwindigkeit der Säurebildung in den Rindenteilen des Käses nicht beeinflußt.

K. J. Demeter (München-Weihenstephan).

Fabian, F. W., and Severens, J. W., Moldiness in Romano cheese. (Journ. of Dairy Sci. Vol. 18. 1935. p. 773—775.)

Bei der Herstellung von Romano-Käse (= Pecorino) aus Kuhmilch kommt es vor, daß sich in der Mitte von vielen Käsen starke Schimmel bilden. Nun besteht in der Praxis die Übung, diese Käse stellenweise zu durchlochen, um das Eindringen der Salzlösung ins Innere zu beschleunigen. Diese Sitte ist an dem gefundenen Übelstand schuld. Der unerwünschte Schimmel wurde isoliert und als Penicillium italicum identifiziert. K. J. Demeter (München-Weihenstephan).

Fuchs, I., Beeinflussung des Sarzinawachstums durch Hefe. (Wochenschr. f. Brauerei. Bd. 53. 1936. S. 1—3.)

Bei der biologischen Prüfung von Hefe auf Spuren von Sarzina findet man diese in der Regel nur in den Kölbchen mit Gärverschluß, woraus vielfach geschlossen wurde, daß dies ein Zeichen der Vorliebe von Sarzina für Luftmangel sei. Diese Annahme trifft aber nicht zu, derartige Sarzinen wachsen ausgezeichnet bei Luftgegenwart. Es ist also die Anaerobiose bestimmt nicht die letzte Ursache für das Gedeihen der Sarzina gewesen. Es konnte bewiesen werden, daß durch Zugabe von Hefeautolysat in geringen Mengen zu Bier das Wachstum der Sarzina angeregt wird und daß auch autolytische Vorgänge im Betrieb dieses Wachstum fördern. Vermutlich ist schon der bei Luftabschluß gegenüber Luftzufuhr veränderte Stoffwechsel der Hefe in den Gärkölbchen geeignet, günstige Bedingungen für die Sarzinen zu schaffen. Durch kräftige Gärung dagegen wird ihr Wachstum gehemmt.

Heuß (Berlin).

Lechner, R., Die Bedeutung der Oxydations-Reduktionspotentiale in den Gärungsgewerben. (Tageszeitg. f. Brauerei. Bd. 33. 1935. S. 365—367.)

Die beiden Reaktionen Oxydation und Reduktion stehen in Wechselbeziehung: es findet eine Oxydoreduktion statt. Mit einer Verschiebung des p_H verändert sich auch das Redoxpotential r_H, bei seiner Bestimmung muß man daher stets mit dem gleichen p_H arbeiten.

Physiologisch wichtige Redoxsysteme sind u. a. das System Cystein-Cystin, das in der Gerste, das System des Glutathions, das in der Hefe vorkommt. Jeder Organismus ist für seine Entwicklung an einen bestimmten r_H-Bereich gebunden und wird von ihm beeinflußt. Bei Aspergillus niger beispielsweise tritt Zitronensäure unter den Oxydationsprodukten der Glukose nur dann auf, wenn das r_H niedriger als 1,55 ist.

Im Molkereigewerbe kann man aus dem Oxydoreduktionszustand der Milch auf ihren Infektionsgrad schließen, in der Brauerei ändern sich mit der Veränderung des r_H durch zutretenden Luftsauerstoff die Entwicklungsmöglichkeiten für Hefen und Bakterien und damit die Bedingungen für die Haltbarkeit des Bieres. Heuß (Berlin).

Eichholtz, F. und **Keil, W.**, Über die chemischen und biologischen Vorgänge bei der Silage. (Chemiker-Zeitung. Bd. 59. 1935. S. 1033—1036.)

Die kunstgerechte Silierung von Futterstoffen umfaßt 4 Teilvorgänge, die den Zweck verfolgen, mit möglichst geringem Verlust an Nährwert, Mineralsalzen und Vitaminen ein Futtermittel mit besten Geruchs- und Geschmackseigenschaften zu gewinnen. Zunächst findet die Abtötung des lebenden Pflanzengewebes statt, die möglichst schnell erfolgen soll. Der zweite Vorgang besteht in der Bildung von Sickersaft, der durch Zerkleinern oder Zugabe von Kochsalz gefördert werden kann und den Nährboden für den dritten Vorgang: die milchsaure Gärung, bildet. Je schneller diese einsetzt, je höher der Säuregehalt steigt, um so sicherer wird das Aufkommen anderer Organismen verhindert. Die hierbei tätigen Bodenbakterien bezeichnet man als „wilde Milchsäurebildner“, die unter ganz außergewöhnlichen Bedingungen zu leben vermögen. Sie spalten nicht nur den Zucker in Milchsäure, sondern haben die charakteristische Eigenschaft, Azetylcholin zu bilden. Sie vertragen Kochsalzkonzentrationen bis zu 12%, wachsen in 40proz. Traubenzuckerlösung, sind gegen hohe Säuregrade unempfindlich und kommen sowohl bei Luftzutritt, als auch bei Luftabschluß fort. Ihre Optimaltemperatur liegt bei 20—30° C. Die Spaltpilze konservieren bei der Silage das gesamte Eiweiß, alle Fette und fast die gesamte Zellulose ohne Zersetzung. Sie konservieren die übrigen Kohlenhydrate in Form von Milchsäure. Sie konservieren ferner die Vitamine, die lebenswichtigen Mineralien und die Geschmacksstoffe, das Futter enthält alle für das Tier wichtigen Stoffe. Anschließend an die Milchsäuregärung kommt es regelmäßig zu einem vierten Vorgang: dem Auftreten von Schimmelpilzen in verschiedenem Umfang, das zu Säureverlusten führt und damit auch unerwünschten Organismen (Essigsäure-, Buttersäure-, Fäulnisbakterien) die Entwicklung im Futterstock ermöglicht. Völlige Abdichtung des Silos verhindert die Entwicklung der Schimmelpilze.

Anzustreben ist die Reinzüchtung von Rassen wilder Milchsäurebazillen mit besonderen Geschmackswerten und die Auswertung des Silageverfahrens für die menschliche Ernährung. Heuß (Berlin).

Mikrobiologie des Düngers, Bodens, Wassers und Abwassers.

Schukowskaja, P., Die Rolle der einzelnen Mikroorganismengruppen bei Stallmistaufbewahrung. [Opyt učeta roli otdel'nych grupp mikroorganismow pri chranenii nawoza.] (Arbeiten des WIUA. Folge 4. 1934. S. 90.) [Russisch.]

Die Verf.n studierte die Rolle der einzelnen Mikroorganismenarten in Stallmist bezüglich seiner Verluste an N und P bei Aufbewahrung, indem sie diese Mikroorganismen in sterilen und gewöhnlichen Stallmist einbrachte. Es wurden folgende Mikroorganismen untersucht: 1. Ammonifikationsbakterien: Bac. mycoides, Bac. mesentericus, Bac. subtilis u. a.; 2. Denitrifikationsbakterien: Bac. denitrificans u. a.; 3. Actinomyceten; 4. Schimmelpilze: Asp. flavus, Penicil. glaucum u. a. Die Versuche zeigten, daß die Bereicherung des Stallmistes mit diesen Mikroorganismenarten seine Verluste an N und P sehr erhöht.

M. Gordienko (Berlin).

Naumowa, A., Die Zählmethoden der Mikroorganismen im Boden und die Charakteristik der Böden U.d. S.S.R. [Metody neposredstwennogo sčeta mikroorganismow w počwe i charakteristika otdel'nych počw Ssojuza.] (Mikrobiologie des Bodens und Düngung. Sammlung II. Folge 108. 1933. S. 115—142.) [Russisch.]

Die Verf.n untersuchte verschiedene Bodenarten (mächtige Schwarzerde, ausgelaugte Schwarzerde, dunkelbraune Erde usw.) auf ihren Bakteriengehalt mittels der Zählmethoden von Winogradsky-Richter und Germanow. Die erstgenannte Methode ergab sehr schwankende Resultate, insbesondere mit Bazillen. Bei der Methode von Germanow betrug der Variationskoeffizient für Bakterien $\pm$ 8,8% bis $\pm$ 6,8%, für Kokken $\pm$ 10,18%, für Stäbchen 29,0%. Die Gesamtzahl der Mikroorganismen betrug 874—2620 $\cdot 10^{-9}$. M. Gordienko (Berlin).

Chlustikowa, M., Die Wirkung verschiedener Temperaturen auf biochemische Bodenprozesse. (Arbeiten des WIUA. Folge 4. 1934. S. 55.) [Russ.]

Zum Versuch benutzte man zwei Bodenarten, und zwar an organischen Stoffen sehr reiche Gewächshauserde und biologisch wenig aktive Schwarzerde. Sterile Bodenproben haben bei niedriger Temperatur keine CO_2, bei höheren Temperaturen (20—30° C) dagegen bedeutende CO_2-Mengen ausgeschieden; die nicht sterilen Bodenproben schieden CO_2 auch bei 0° C aus. Die Menge des wasserlöslichen Humus und der wasserlöslichen Phosphorsäure stieg mit der Temperatur und parallel der aus dem Boden ausgeschiedenen CO_2-Menge. Bei der Temperatursteigerung von 0° auf 30° C vergrößert sich auch die Nitratenmenge im Boden; bei weiterem Temperaturanstieg wurde die Nitrifikation schwächer, bei 65° C wurden keine Nitrate gefunden. Die Menge der Mikroorganismen im Boden wächst mit dem Temperaturanstieg, doch nur bis zu einer gewissen Grenze, die für verschiedene Bodenarten verschieden ausfällt. Die einer hohen Temperatur (65—90° C) ausgesetzten Bodenproben zeigten später bei der Impfung mit Ausgangsboden gesteigerte Zellulosezersetzung und Stickstoffanreicherung. Die Bakterienzahl stieg in diesen Bodenproben sehr bedeutend.

M. Gordienko (Berlin-Schöneberg).

Sluchaj-Natal'čenko, A., Die Wirkung der Giftstoffe auf biochemische Prozesse und auf die Mikroflora des Bodens. (Die Chemisation d. soz. Landw. Bd. 2. 1934. S. 44—49.) [Russ.]

Es wurde die Wirkung des Benzols, Xylols, der Polychloride (in Mengen von 40—120 g/qm) und des Chlorpikrins (in Mengen von 20—60 g/qm) auf Wiesenboden studiert, indem man diesen Boden nach Behandlung mit den Giftstoffen mikrobiologisch untersuchte (nach 7, sodann nach 30 und 60 Tagen nach der Behandlung). Es wurde festgestellt, daß diese Giftstoffe das mikrobiologische Leben des Bodens allgemein nicht verschlechtern, ja in manchen Fällen tragen sie sogar zu ihrer Verbesserung bei.

M. Gordienko (Berlin-Schöneberg).

Kornejewa, N., Mikroflora des Bodens bei verschiedener Zusammensetzung der Strukturaggregate. (Wissenschaftl. Schriften d. Zuckerindustrie. Bd. 27. 1933. S. 105—112.) [Russ.]

Verf. untersuchte die Wirkung der physikalisch-chemischen Bodeneigenschaften auf die Mikroflora. Versuchsboden: Schwarzerde (unter Rüben und Hirse) mit Strukturaggregaten von 1,5—8 mm Größe. Die Untersuchungen zeigten, daß zwischen der Bakterienmenge und der Größe der Strukturaggregate ein Zusammenhang besteht, und zwar steigt die Bakterienmenge mit der Verminderung der Größe der Strukturaggregate, doch wird dieser Unterschied mit der Zeit geringer (da mit der Zeit die Strukturaggregate größer werden). Auf den Parzellen mit 3 mm großen Strukturaggregaten betrug die Bakterienmenge $37{,}4 \cdot 10^{-6}$ je g Boden, auf denen mit 5,0—8,0 mm großen Strukturaggregaten — $16{,}3 \cdot 10^{-6}$ je g Boden; nach 3 Monaten schwankte aber die Bakterienmenge auf den beiden Parzellen von $18{,}9 \cdot 10^{-6}$—$13{,}5 \cdot 10^{-6}$ je g Boden. Azotobakter war in den Bodenproben mit größeren Strukturaggregaten stärker vertreten als in denen mit kleinen Strukturaggregaten. Pilze zeigten so gut wie keine Abhängigkeit von der Bodenstruktur. M. Gordienko (Berlin-Schöneberg).

Krassil'nikow, N., Die Entwicklung der Mycobakterien des Bodens. (Vorträge der Akademie der Wissenschaften d. U. d. S.S.R. Bd. 2, Nr. 9. 1934. S. 577—583.) [Russ.]

Verf. untersuchte einige aus den Böden des Transwolgagebietes isolierte Mycobakterienarten. Dieselben teilt er in 3 Gruppen ein: 1. Mycobakterien mit Sporenbildung; 2. Mycobakterien ohne Sporenbildung; 3. Mycobakterien, die den Actinomyceten nahestehen. Mycobakterien sind in den humusreichen Böden sehr verbreitet, wobei sie sich möglicherweise an der Verarbeitung der Humusstoffe beteiligen. M. Gordienko (Berlin-Schöneberg).

Castellani, E., Les microorganismes et l'absorption polaire du sol en rapport à la dynamique du Calcium. (Soc. Intern. di Microbiol. Boll. della Sez. Ital. Vol. 7. 1935. p. 279—281.)

Da nach den Untersuchungen von Vageler und Alten, Jenny und Cowan sowie von Dojmi das Calcium aus den Absorptionskomplexen des Bodens durch die Einwirkung höherer Pflanzen fortgesetzt herausgelöst bzw. verdrängt und dann ausgefällt wird, müßten diese so allmählich an Calcium verarmen, was die Struktur des Bodens ungünstig beeinflussen müßte, wenn nicht gleichzeitig ein rückläufiger Prozeß stattfände. Dieser

hat nach den Untersuchungen Verf.s seinen Ursprung in der Tätigkeit von Mikroorganismen, wodurch das Calcium wieder gelöst und in die Absorptionskomplexe zurückbefördert wird. Demnach sind die Mikroorganismen in der Dynamik des Bodens hinsichtlich des Calcium-Kreislaufs die sehr wichtigen Gegenspieler der höheren Pflanzen. Bortels (Berlin-Dahlem).

Franzew, A., Zur Methodik der biologischen Berechnung der Stickstoffassimilation des Bodens. (Microbiology. Vol. 4. 1935. p. 81—85.) [Russisch.]

Zur Bestimmung des Stickstoffbedarfes des Bodens wurden Algen angewandt. Scenedesmus quadricauda-Kulturen wurden im Apparat von Kolkwitz durch ein Membranfilter filtriert und der Filter auf eine Kochsche Schale mit der zu untersuchenden Erde gelegt. Die Versuche dauerten 4 Tage bei künstlicher Beleuchtung nach Hartmann. Je nach der Temperatur und dem Stickstoffgehalt der Erde war die Kolonienzahl verschieden. Auf einem auf Lehmboden gelegten Filter entwickelten sich nach 4 Tagen 493 000, auf Waldboden 357 000, auf altem zersetztem Dünger 3 648 000 Kolonien. Die Ausgangszahl der Kolonien war in allen Fällen 339 000. A. Imšenecki (Moskau).

Ber, W. und Krestnikowa-Ssysojewa, O., Die thermische Sterilisation des Bodens als Unkrautbekämpfungsmethode. [Termičeskaja sterilizatija počwy kak metod borby s sornjakami.] (Aus den Arbeiten der Abteilung f. Unkrautbekämpfung des WIUA.) (Die Chemisation d. soz. Landwirtschaft. Bd. 7. 1935. S. 85—94.) [Russisch.]

Verff. bearbeiteten den Boden mit heißem Dampf, der mit 5—7 Atm. Druck durch ein Röhrensystem zu den Gewächshäusern geleitet wurde. Die Untersuchung bezweckte, die Wirkung verschiedener Temperaturen auf die Lebenstätigkeit und Keimfähigkeit der Unkrautsamen, sowie einiger Mikroorganismen festzustellen. Es wurde die Wirkung einer Temperatur von 40, 60 und 70° bei 30 Min. Dauer, sodann die von 90° bei 10 Min. Dauer geprüft, wobei die Temperaturmessung in einer Tiefe von 12 cm erfolgte. Die Temperaturwirkung äußerte sich in folgender Weise: 1. Durch die Erwärmung des Bodens erlitten die nitrifizierenden Bakterien keine direkte Schädigung, doch wurde durch diese Erwärmung die Entwicklung der denitrifizierenden und der Fäulnisbakterien stark stimuliert, so daß die Tätigkeit der Nitrifikationsbakterien anfänglich merklich unterdrückt wurde. 2. Die Erwärmung des Bodens auf 90° führte zuerst zu einer bedeutenden Verminderung des Nitrifikationsprozesses, später stieg aber die Tätigkeit der Nitrifikationsbakterien wieder. 3. Auf die denitrifizierenden Bakterien übte die Erwärmung des Bodens auf 70 und auf 90° keinen schädlichen Einfluß aus. 4. Auf Azotobacter chroococcum wirkte die Erwärmung des Bodens anfänglich schädlich, später aber (nach 20 Tagen) stieg seine Entwicklung auf die frühere Höhe. 5. Auf aerobe zellulosezersetzende Bakterien wirkte die Erwärmung des Bodens tötend. 6. Auf Ammonifikationsprozesse wirkte die Erwärmung stimulierend. — Was nun die Unkrautsamen anbetrifft (es sei bemerkt, daß künstlich Sinapis arvensis, Camelina linicola, Lolium linicola, Spergula maxima, Polygonum lapathifolium usw. eingesät wurden), so betrug die Zahl der keimungsfähigen Unkrautsamen nach der Erwärmung auf

40° (30 Min. lang) in der oberen, 1 cm starken Bodenschicht 0, in einer Tiefe von 1 bis 5 cm 150, in einer Tiefe von 5 bis 12 cm 1350 Stück; bei der Erwärmung auf 60° (30 Min. lang): 0, 0, 300 Stück; bei der Erwärmung auf 90° (10 Min. lang): 0, 0, 0. In nicht erwärmtem Boden betrug die Zahl der keimungsfähigen Unkrautsamen in den drei oben aufgezählten Bodenschichten entsprechend 1800, 1350, 1500 Stück. M. Gordienko (Berlin).

Ljubimow, W., Beobachtungen über die Rolle der Fadenalgen bei Massenentwicklung für die Selbstreinigung des Gewässers. (Mikrobiology. Vol. 4. 1935. S. 258—261.) [Russisch.]

An Stellen, wo Nährstoffe ins Wasser gelangen (Abflüsse), wird reichliche Entwicklung von Fadenalgen (Cladophora fracta) und dicken Spirogyra (Sp. crassa, Sp. Warwarae), die im Vergleich mit den zarten Arten mehr Stickstoff beanspruchen, beobachtet. Entsprechende Untersuchungen zeigten, daß Algen aus einem Hektar Gewässer 35—45 kg Stickstoff entfernen. Fadenalgen sind folglich für die Reinigung der Gewässer von großer Bedeutung. A. Imšenecki (Moskau).

Schädigungen der Pflanzen durch Pilze, Bakterien und filtrierbare Vira.

Rieger, H., Phytophthora-Vorbeuge und -Bekämpfung. (Dtsch. Landw. Presse. Bd. 62. 1935. S. 135, 2 Abb.)

Verf. erzielte gute Erfolge bei der Bekämpfung von Phytophthora an Frühkartoffeln mit Kupferkalk Wacker im Jahre 1933. Die 1. Spritzung wurde mit 1,5 proz., die 2. mit 1 proz. Brühe durchgeführt. Besonderer Wert wurde auf die Bespritzung der Unterseite gelegt. Es wurden Mehrerträge bis zu 125 dz/ha erzielt. Die Kosten für Spritzmittel betrugen bei einmaliger Bespritzung etwa 5 RM. je ha. Mit einer Karrenspritze konnte ein Mann an einem Tage etwa 1 ha bespritzen.

Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Sprague, R., Wojnowicia graminis as a very weak, secondary parasite of winter cereal crops. (Phytop. Vol. 25. 1935. p. 405—415, 2 figs.)

Heald berichtete zunächst über das Vorkommen von 2 Pilzen an fußkrankem Weizen, die in Kultur keine Sporen bildeten. McKinney und Johnson identifizierten einen von den Pilzen als Wojnowicia graminis. W. graminis ist in Australien weit verbreitet und kommt im Nordwesten und Norden der Vereinigten Staaten und auch in Europa vielfach zusammen mit anderen Pilzen vor. Das vegetative Myzel des Pilzes wurde von Triticum dicoccum, T. monococcum, T. spelta, Hordeum vulgare, Secale cereale, Avena sativa, Agropyron inerne, A. riparium, Bromus tectorum, Koeleria cristata und Poa sandbergii isoliert. Immer war er mit Cercosporella herpotrichoides vergesellschaftet. Pykniden wurden nur an Triticum vulgare gefunden. Verf. kommt auf Grund seiner Versuche zu dem Ergebnis, daß W. graminis eine Spezies ist mit einer Menge von physiologischen Formen oder Stämmen, daß einige Varietäten mit abweichenden morphologischen Merkmalen vorkommen und daß der Pilz ein sehr schwacher Parasit an verschiedenen Sorten von Getreide und Gräsern ist. Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Meyer-Hermann, K., Beobachtungen über das Vergilben der Wintergerstensaat. (Dtsch. Landw. Presse. Bd. 62. 1935. S. 27, 5 Abb.)

Durch zahlreiche Untersuchungen konnte festgestellt werden, daß es sich bei dem Vergilben der Wintergerste im Herbst um zwei Krankheitsformen handelt, um Nährstoffmangel und um Gerstenmehltau. Bei Versuchen zur Windhalmbekämpfung mit ungeöltem und Perl-Kalkstickstoff zeigte sich, daß alle Parzellen, die Ende Oktober Kalkstickstoff erhalten hatten, keinen Mehltau aufwiesen. Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Johnson, E. M., and Valleau, W. D., Cultural variations of Thielaviopsis basicola. (Phytop. Vol. 25. 1935. p. 1011—1018, 2 figs.)

Thielaviopsis basicola zeigte in Kultur außerordentlich starke Variationen in bezug auf Farbe der Kultur, Zahl, Art und Größe der Sporen. Das Perfekt-Stadium wurde in keiner Kultur beobachtet. Infektionsversuche an White-Burley-Tabak ergaben, daß die verschiedenen Variationen etwa in gleichem Maße pathogen waren. Nur eine „Albino"-Kultur schien stärker pathogen als die andere zu sein. Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Davis, W. H., Summary of investigations with Ustilago striaeformis parasitizing some common grasses. (Phytop. Vol. 25. 1935. p. 810—817.)

Verf. kommt auf Grund seiner Untersuchungen zu dem Ergebnis, daß bestimmte physiologische Formen von Ustilago striaeformis an bestimmte Wirtspflanzen gebunden sind. Dagegen wird die an Dactylis glomerata vorkommende Form als neue Spezies Ustilago clintoniana sp. nov. bezeichnet. Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Mitra, M., Stinking smut (Bunt) of wheat with special reference to Tilletia indica Mitra. (Indian Journ. of Agric. Sc. Vol. 5. 1935. Heft 1. S. 51—74; 7 Taf.)

In Indien kommen am Weizen 3 Tilletia-Arten, T. caries, T. foetens und T. indica, vor. Erstere richtet hauptsächlich in den bergigen Gegenden großen Schaden an, während die beiden letzteren die Weizenfelder der Ebene heimsuchen. T. indica besitzt im Vergleich zu T. caries wesentlich längere Sporen, befällt das Korn nur teilweise und erzeugt schwarze Sporen. T. caries und T. foetens dagegen zerstören mit Ausnahme der Schale die ganze Frucht und besitzen oliv- bis rötlichbraune, pulverige Sporen.

Da die befallenen Körner gänzlich oder teilweise von den Glumae eingehüllt sind, ist die Ausbreitungsmöglichkeit auf dem Felde gering. Die Hauptgefahr für eine ausgiebige Infektion liegt beim Dreschen und Lagern des Getreides. Die Infektionsversuche ließen erkennen, daß der Befall in hohem Grad von den Umweltsbedingungen abhängig ist.

Fungizide Mittel, wie Uspulun, Kupferkarbonat, Ceresan und Formalin, können bei mäßigem Befall nur schwer das Perikarp, durch das die Sporen geschützt werden, durchdringen und vermögen nicht, die Krankheit vollständig zu hemmen. Bessere Erfolge ließen sich mit der Heißwasser-Methode erzielen. Bärner (Berlin-Dahlem).

Hart, H., and Zaleski, K., The effect of light intensity and temperature on infection of Hope wheat by Puccinia graminis tritici. (Phytop. Vol. 25. 1935. p. 1041—1066, 6 figs.)

Im Sämlingsstadium war die Weizensorte Hope im Gewächshaus gegen Form 21 von Puccinia graminis tritici anfällig, dagegen nicht im älteren Stadium. Im Extrakt von älteren Weizenpflanzen keimten die Uredosporen zwar weniger als in destilliertem Wasser, doch ebensogut wie im Extrakt der anfälligen Sorte Marquis. Unter normaler, starker Sonnenbestrahlung des oberen Mississippi-Tales war die Sorte Hope ebenfalls in den verschiedenen Stadien außer dem Sämlingsstadium in hohem Maße resistent gegen Form 21. Wenn die Pflanzen beschattet wurden, wurden sie stark anfällig. Hohe Temperaturen hatten denselben Einfluß wie starke Sonnenbestrahlung. Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Ivanoff, S. S., Studies on the host range of Phytomonas stewarti and P. vascularum. (Phytop. Vol. 25. 1935. p. 992—1002, 3 figs.)

Verf. führte Infektionsversuche mit Phytomonas stewarti an Zea mays, Holcus sorghum, Holcus sudanensis, Setaria glauca, Setaria italica var. stramineofructa, Panicum miliaceum und mit P. vascularum an Zea mays, Holcus sorghum und Saccharum officinarum durch. Die durch P. stewarti an Blättern von Holcus sorghum, H. sudanensis, Setaria glauca, S. italica var. stramineofructa und Panicum miliaceum hervorgerufenen Krankheitssymptome ähnelten durchweg denen an Zea mays. An Blättern von Zea mays und Holcus sorghum zeigten sich nach Infektion mit P. vascularum ähnliche Symptome wie bei Zuckerrohr. An Mais rief P. vascularum ein Faulen an den Stengeln wie P. stewarti hervor. An Stengeln von Holcus sorghum wurden nach Infektion mit P. vascularum eingefallene Stellen beobachtet.

Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Pape, H., Über eine Mosaikkrankheit der Kohlrübe. (Dtsch. Landw. Presse. Bd. 62. 1935. S. 319—320, 4 Abb.)

Verf. beschreibt eine Mosaikkrankheit der Kohlrübe, die wahrscheinlich durch ein Virus verursacht wird. Sie macht sich seit etwa 2 Jahren auf den Kohlrübenfeldern Schleswig-Holsteins bemerkbar. Der Befall betrug bis zu 90%. Mehrfach konnte festgestellt werden, daß die in der Nähe von Gebüschen stehenden Kohlrüben besonders stark befallen waren. Von Kohlrüben, die zu 3 verschiedenen Zeiten — Ende April, am 8. und am 20. Mai — gedrillt worden waren, wiesen die zuletzt gedrillten Rüben Mitte September den geringsten Befall auf. Die einzelnen Kohlrüben scheinen verschieden anfällig zu sein. Stark befallen waren: Seefelder, Gelbe Wilhelmsburger, Gelbe und Weiße Criewener; mittelstark befallen: Wilhelmsburger Oetofte, Bangholm, Wiebolt VII, Bangholm Herning B, Incomparable; schwach befallen. Pommersche Kannen, Gelbe Sarling, Weiße Schmalz; praktisch nicht befallen war eine als „Heinkenborstler“ bezeichnete Sorte. An Blattmasse ergaben kranke Pflanzen bis zu 63%, an Rübenmasse bis zu 57% weniger als gesunde. Die Übertragungsversuche führten bisher noch zu keinem eindeutigen Ergebnis und werden fortgesetzt.

Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Schreven, D. A. van, Virusziekten van de tomaat. [Viruskrankheiten der Tomate.] (T. o. Pl. 1935. Heft 10. S. 261—294, m. 7 Abb.)

Verf. bespricht ausführlich eine Anzahl verschiedener Viruskrankheiten der Tomate. Die Eigenschaften dieser Krankheiten mögen hier ganz kurzgefaßt wiedergegeben werden:

1. Gewöhnliche Tomatenmosaikkrankheit (Tabakmosaikkrankheit Nr. 1, Ordinary oder Mild Mosaic).

Filtrierbares Virus, verursacht blaßgrüne Flecke auf den jungen Blättern. Wachstum der Pflanzen etwas gehemmt. Ernte nicht erheblich beeinflußt. Histologisch gekennzeichnet durch Abnahme der Chloroplasten. Schnelle Ausbreitung in jungen, langsame in älteren Pflanzen. Virus sehr resistent, letale Temp. 90° C. Wirtspflanzen: Sol. lycopersicum, Nicotiana tabacum, Lycopersicum esculentum u. a. m. Verbreitung durch die Blattlaus Myzus persicae. Bekämpfung durch Benutzung gesunder Saat und Entfernung kranker Pflanzen.

2. Aucuba Mosaikkrankheit (Tabakmosaikkrankheit Nr. 6, Yellow Mosaic). Filtrierbares Virus, verursacht gelbe Flecke. Die jungen Blätter krümmen sich nach unten, die Blattoberfläche wird uneben. Wachstum der Pflanzen stark gehemmt. Histologisch gekennzeichnet indem die Plastiden oft in der Entwicklung gehemmt werden oder fehlen. Ausgewachsene Chromatophoren werden jedoch nicht mehr angegriffen. Trotz der Wachstumshemmung bilden die Pflanzen ebensoviele Blätter und Blüten wie normale Pflanzen. Das Virus breitet sich nicht in den Gefäßteilen (Xylem) aus, nur in den Siebteilen (Phloem) und im lebenden Parenchym. Es ist ziemlich resistent gegen hohe Temperaturen, letale Temp. 90° C. Wirtspflanzen: Sol. lycopersicum, Nicotiana tabacum, Sol. nodiflorum. Verbreitung durch Berührung oder Verletzung. Bekämpfung wie vorige.

3. Komplexe Streifenkrankheiten (Mixed-virus streak).

Filtrierbares Virus, verursacht dunkle Streifen auf den Blattnerven, Stielen und Stengeln, starke Kräuselung der Blattspreite. Untersuchungen haben dargetan, daß es aus verschiedenen Komponenten zusammengesetzt ist. So konnte die Krankheit künstlich hervorgerufen werden durch Kombination von sog. „healthy potato virus"-Arten mit dem Tabakvirus Nr. 1. Es kann durch die Blattlaus Myzus persicae nicht übertragen werden. Histologisch ist das Krankheitsbild sehr variabel. Jedenfalls steht fest, daß Anthozyan gebildet wird. Letale Temp. 66° C. Wirtspflanzen: Sol. lycopersicum, Nicotiana tabacum, Nic. glutinosa, Datura stramonium.

4. Tomaten Streifen-Virus Nr. 1 (Glasshouse streak, Stripe, Single virus streak).

Diese Krankheit kann sich auf dreierlei Art äußern: 1. Ausschließlich als Mosaik; 2. als Mosaik in Verbindung mit nekrotischen Flecken auf den Blättern, Stielen und Stengeln; 3. als nekrotische Flecke und Streifen ohne Mosaik. Histologisch äußert die Krankheit sich durch nekrotische Komplexe im Mark- und Rindenparenchym, wobei die befallenen Zellen eine dunkelbraune Wand aufweisen. Letale Temp. 90° C. Wirtspflanzen: Sol. lycopersicum, Nic. tabacum, Nic. glutinosa, Sol. capsicastrum u. a. m. Übertragung der Krankheit durch Berührung oder Verletzung. Bekämpfung wie bei Tomatenmosaik.

5. Stengelstreifen, Krankheit der Tomate (Stem necrosis streak, Tabak virus Nr. 9).

Auf den Blättern entstehen die Erscheinungen des Mosaik, auf den Blattstielen und Stengeln nekrotische Komplexe. Letale Temp. 90° C. Das Virus ist filtrierbar. Wirtspflanzen: Sol. lycopersicum, Nic. tabacum, Nic. glutinosa und Datura stramonium. In Amerika gefunden, nicht in England.

6. Ring Mosaik, Streifenkrankheit der Tomate (Ring mosaic streak).

Auf den Blättern entstehen gelbe, ausgedehnte Flecke, während die Pflanzen nur wenig in ihrem Wachstum gehemmt werden. Nekrotische Flecke unregelmäßig verbreitet an älteren Pflanzenteilen, darunter Stengeln, Blattstielen und Blättern. Bei Infektionsversuchen starker Befall der Früchte. Wirtspflanzen: Sol. lycopersicum, Nic. tabacum, Nic. glutinosa und Datura stramonium. Letale Temp. des filtrierbaren Virus 80° C. In Amerika gefunden, nicht in England.

7. „Spotted Wilt."

Diese Krankheit äußert sich durch anfängliche Aufhellung der Blattnerven, später durch typische bronzefarbene, ausgedehnte Flecke ineinander übergehend oder isoliert und dann kreisrund. Die Früchte können auch angegriffen werden und zeigen dann konzentrische Ringe. Das nur unter besonderen Umständen filtrierbare Virus besitzt eine letale Temp. von 42° C. Wirtspflanzen: Sol. lycopersicum, Sol. capsicastrum, Sol. dulcamara, Nic. tabacum, Nic. glutinosa, Datura stramonium u. a. m. Ebenso Cineraria, Chrysanthemum und Gloxinia. Übertragung durch Berührung oder Verletzung, jedoch nicht so leicht wie bei Tomatenmosaik. Auch durch Larven von Thrips tabaci. Bekämpfung durch Vernichtung der genannten Larven Entfernung der befallenen Pflanzen und Benutzung gesunder Saat.

8. „Big bud." (Blue top, bunchy top).

Typisch ist eine blasenförmige Anschwellung der Kelche. Der Befall umfaßt gewöhnlich nur wenige Prozente der Pflanzen. Fruchtbildung wird stark gehemmt. Schon gebildete Früchte werden hart und zähe und färben sich mitunter orange. Histologisch äußert die Krankheit sich durch eine abnorme Ausdehnung des Phloems zu einem schwammartigen Gewebe, 1—2 mm dick. Wirtspflanzen: Sol. lycopersicum, Sol. nigrum.

10. „Bunchy top."

Bei dieser Krankheit bleiben die Pflanzen klein mit ganz kleinen Blättern, während auf Blättern und Stengeln ausgedehnte nekrotische Flecke entstehen. Keine Chlorose. Später entstehen schmale braune oder schwarze Streifen an der Unterseite der Blätter. Die Ernte wird herabgesetzt durch Mißbildungen oder Kleinbleiben der Früchte, welche jedoch keine Nekrose zeigen. Das Virus ist nicht filtrierbar. Wirtspflanzen: Sol. lycopersicum. Übertragung durch Berührung und wahrscheinlich durch Insekten. Bekämpfung durch Entfernung der kranken Pflanzen oder Behandlung mit Insektiziden, schließlich durch Ausrottung aller zu den Solanaceae gehörigen Unkräutern.

van Beyma thoe Kingma (Baarn).

Bennet, C. W., Studies on properties of the curly top virus. (Journ. Agric. Research. Vol. 50. 1935. p. 211.)

Die künstliche Übertragung der Curlytop-Krankheit der Rübe (Beta) durch Einimpfen von virushaltigem Gewebesaft gelingt nur sehr unsicher. Man muß sich deshalb bei Untersuchungen über die Eigenschaften des Virus der Zikade Eutettix tenellus, des natürlichen Krankheitsüberträgers bedienen, der sich, wie man nach Untersuchungen von Carter weiß, an tierischen Membranen, die eine virushaltige Nährflüssigkeit umschließen, füttern läßt und dabei das Virus aufnimmt. Gewöhnlicher Rübenrohsaft wird von den Tieren nicht angenommen, dagegen erwies sich der Phloëminhalt als besonders geeignet, der bei kranken Pflanzen als natürliches Exsudat aus Blättern und Blattstielen und in größerer Menge aus der Wundfläche durchschnittener kranker Rübenkörper austritt. Rübenpreßsaft muß vor der Verwendung mit Alkohol oder Azeton gereinigt werden. Das Phloëmexsudat erwies sich als besonders virusreich. Die Tiere übertrugen das Virus noch aus Verdünnungen 1 : 20 000. Das Virus passiert ungehindert die gewöhnlichen Bakterienfilter. Während es im Rübenblättersaft seine Aktivität in wenigen Tagen oder Wochen verlor, blieb es in ausgetrocknetem Phloëmexsudat 10 Monate, im getrockneten Rübengewebe 4 Monate, in getrockneten Zikaden 6 Monate wirksam. Seine Tötungstemperatur liegt zwischen 75 und 80°. Das Virus erwies sich als ungewöhnlich resistent gegen eine Reihe der gebräuchlichen Desinfizientien. — Weitere Untersuchungen galten der Frage der Lokalisierung des Virus in der Pflanze.

E. Köhler (Berlin-Dahlem).

Abgeschlossen am 15. Juli 1936.

Zentralblatt für Bakt. etc. II. Abt. Bd. 94. No. 24|26.
Ausgegeben am 21. September 1936.

Azotobakterwachstum und Stickstoffbindung in Abhängigkeit vom Wetter.

Vorläufige Mitteilung.

[Aus der mikrobiologisch-chemischen Abteilung der Biologischen Reichsanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem.]

Von **C. Stapp** und **H. Bortels.**

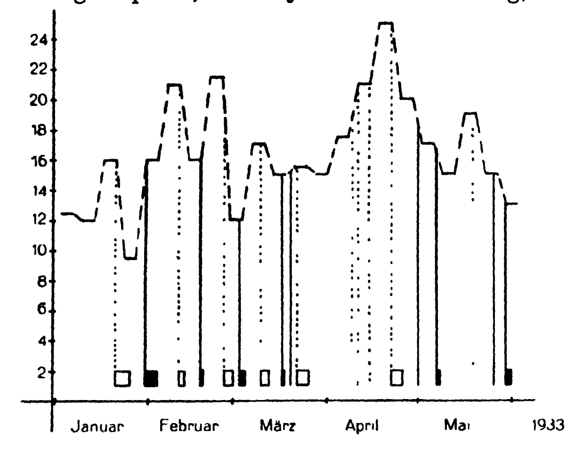
Mit 1 Abbildung im Text.

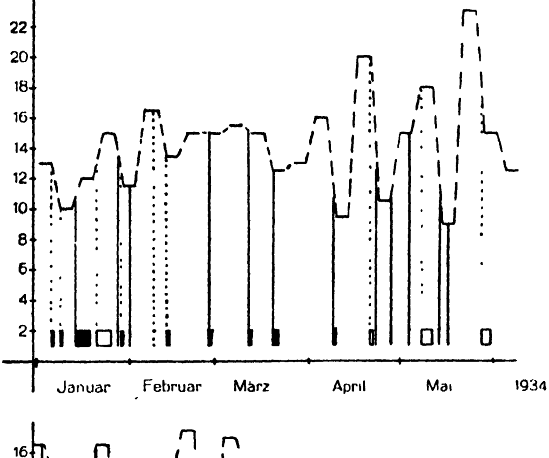
Im Verlaufe von Untersuchungen über Entwicklung und Stickstoffbindung des Azotobakters wurde die Beobachtung gemacht, daß jeweils dieselben Stämme von A. chroococcum in der gleichen synthetischen stickstofffreien Nährlösung und unter sonst anscheinend völlig gleichen Kulturbedingungen in Erlenmeyer-Kolben aus Jenaer Geräteglas Nr. 20 zeitweilig besser und zeitweilig schlechter wuchsen. Es kam vor, daß die Entwicklung der Bakterien in aufeinanderfolgenden Versuchen während mehrerer Wochen fast völlig ausblieb und dann plötzlich wieder sehr stark einsetzte, obwohl peinlichst genau auf die Innehaltung konstanter Versuchsbedingungen geachtet wurde. Irgendeine Änderung in der Zusammensetzung der Nährlösung war ausgeschlossen; sie enthielt alle notwendigen Stoffe einschließlich Molybdän.

Dieses sonderbare Verhalten des Azotobakters war zunächst unerklärlich. Im Laufe der Zeit wurden aber Beziehungen unverkennbar, die zwischen der Wetterlage einerseits und der Entwicklung und Stickstoffbindung des Azotobakters andererseits zu bestehen schienen: Perioden schlechten Azotobakter-Wachstums fielen im allgemeinen zusammen mit Zeiten schlechten Wetters. Umgekehrt wuchs Azotobakter kräftig, wenn das Wetter als ausgesprochen „schön“ zu bezeichnen war. Daß die seit langem bekannten jahreszeitlich bedingten Einflüsse hier nicht als Ursache in Frage kamen, die im wesentlichen in Temperatur und Feuchtigkeit zu suchen sein dürften und sich nur im Erdboden des Freilandes bemerkbar machen, ist klar. Auch durch unmittelbaren Vergleich des Wachstums mit dem während der Entwicklungszeit des Azotobakters herrschenden örtlichen Luftdruck wurden keine eindeutigen Ergebnisse erhalten.

Um die offensichtliche Abhängigkeit des Azotobakters vom Wetter genauer erkennen und verfolgen zu können, wurde in wöchentlicher Wiederholung folgender Versuch ausgeführt: Jeweils am Dienstag wurden zwei 750 ccm fassende Erlenmeyer-Kolben, die je 100 ccm Nährlösung enthielten, mit stets annähernd gleichen Mengen einer 7 Tage alten Möhrenagar-Kultur von A. chroococcum, Stamm R_1, beimpft und bis Sonnabend, also 4 Tage, bei 29° C ohne Erschütterung im Thermostaten stehengelassen. Hierauf wurde das Kultursubstrat mit Salzsäure angesäuert, bis

zur gleichmäßig feinen Zerteilung der Bakterienmasse gekocht und diese zum Absetzenlassen in völlig gleiche Sedimentierröhrchen überführt. 2 Tage später, also jeweils am Montag, wurden die Schichthöhen der Sedimente in Millimetern gemessen und die erhaltenen Zahlen als Maß für das Azotobakter-Wachstum verwertet.





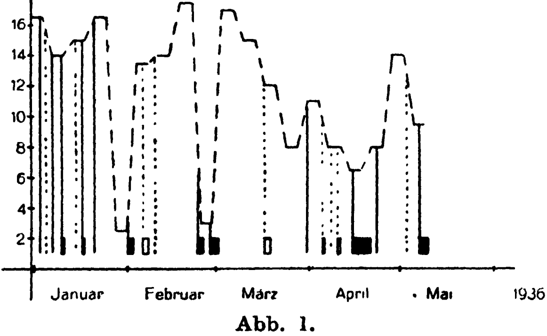


Abb. 1.

Ein Teil der Ergebnisse dieses über mehrere Jahre ausgedehnten Versuches ist in den graphischen Darstellungen wiedergegeben. Die Schichthöhen der Sedimente sind in Millimetern auf der Ordinate und die zugehörigen Tage auf der Abszisse eingetragen, und zwar entsprechen die an den 4 Kulturtagen geernteten Azotobaktermengen den in entsprechender Höhe horizontal verlaufenden Abschnitten, die durch gestrichelte Linien miteinander verbunden sind. Um auch das Wetter in diese Darstellung einzubeziehen, sind die Tage, an denen Berlin deutlich im Bereich eines Hochdruck- bzw. eines Tiefdruckgebietes lag, durch die leeren bzw. ausgefüllten Blocks entlang der Abszisse gekennzeichnet. Die von diesen nach oben führenden gepunkteten bzw. ausgezogenen Linien verbinden den ersten Tag im Hoch- bzw. Tiefdruckgebiet mit der Wachstumslinie. Es ist daraus deutlich zu sehen, daß eine Änderung in der Wachstumsgröße der zugehörigen Wetteränderung gewöhnlich etwas vorauseilt. A. chroococcum vermag also in solchen Fällen das kommende Wetter gewissermaßen vorherzusagen.

Was die unmittelbare Ursache für dieses sonderbare Verhalten des Azotobakters betrifft, so sind die Arbeiten hierüber noch nicht abgeschlossen. Jedenfalls konnte der Wettereinfluß nicht ausgeschaltet werden

dadurch, daß die Kulturen in einer Kammer aufbewahrt wurden, deren Wände aus 4 mm Blei und 1 mm Eisen bestanden. Ebenso war es gleichgültig, ob im Laboratorium oder 1000 m unter der Erdoberfläche im Salzbergwerk kultiviert wurde. Die Luftzusammensetzung verschiedener Zeiten schien belanglos zu sein. Auch Radiumbestrahlung sowie Ionisierung der Luft durch Ultraviolettbestrahlung blieben ohne Einfluß auf die Wetterwirkung; ebensowenig ließen die Höhenstrahlen[1]) Beziehungen zu der Azotobakter-Entwicklung erkennen.

Es sei hier noch auf Beobachtungen hingewiesen, die so oft gemacht werden konnten, daß Zufälligkeiten ausgeschlossen zu sein scheinen. Zwischen der Wetterfühligkeit des Menschen und dem Verhalten des Azotobakters durften insofern gewisse Beziehungen bestehen, als zu Zeiten, zu denen die betreffenden Menschen sich sehr stark durch das Wetter behindert fühlten, auch Azotobakter-Wachstum und Stickstoffbindung sehr gering waren, während an den Tagen, an denen die betreffenden Personen ein deutliches Gefühl des Wohlbefindens verspürten, auch Entwicklung und Stickstoff-Fixation des Azotobakters deutlich besser waren.

Gleichzeitig in Berlin und in Göttingen[2]) durchgeführte Versuche haben eine weitere Bestätigung der aufgedeckten Beziehungen gebracht, so daß auf Grund der mehrjährigen Beobachtungen und Erfahrungen nunmehr geschlossen werden muß, daß Wachstum und Stickstoffbindung durch Azotobakter abhängig sind von der Lage des Versuchsortes zu der während und kurz nach dem Versuch herrschenden Luftdruckverteilung.

Nähere Einzelheiten werden später veröffentlicht.

Nachdruck verboten.

Die Leistungen der Einzelzellen verschiedener Stämme von Streptococcus lactis.

[Aus dem Institut für Gärungsgewerbe und landwirtschaftliche Bakteriologie beim Mus. für Gew. u. Landwirt., Warschau.]

Von **J. Supińska** und **T. Matuszewski.**

I. Einleitung.

Wir können nach folgenden Formeln die Vermehrungsgeschwindigkeit und Gärleistung von Bakterienzellen bestimmen:

$$k = \frac{\log N_T - \log N_O}{T \log e} \tag{1}$$

$$s = \frac{Sk}{N_O (e^{kT} - 1)} = \frac{Sk}{N_T - N_O} \tag{2}$$

Es bedeuten: k = der Teil der Zellen, welcher in der Zeiteinheit der Teilung unterliegt (Vermehrungskoeffizient), s = die Menge der Substanz (z. B. Säure), welche von einer Zelle in der Zeiteinheit produziert wird.

---

[1]) Herrn Prof. Dr. Kolhörster sei für die freundliche Überlassung der Daten über die Höhenstrahlenmessungen von Februar 1933 bis April 1934 nochmals bestens gedankt.

[2]) Dort ausgeführt von Herrn Prof. Dr. Rippel, dem hierfür auch an dieser Stelle verbindlichst gedankt sei.

Folgende Werte müssen empirisch bestimmt werden: N_O d. h. die Anzahl der Zellen am Anfang der Untersuchung, N_T = die Anzahl der Zellen am Ende der Untersuchung, T = die Zeitdauer der Untersuchung, S = die ganze Menge der Substanz, welche von den Bakterien in der Zeit T produziert wird.

Die Formeln sind nur dann anwendbar, wenn die Voraussetzungen, die für die Bearbeitung der Gleichungen dienen, in Wirklichkeit erfüllt sind. Die Voraussetzungen sind folgende: a) die Bakterien befinden sich in der logarithmischen Phase der Zellteilung, b) jede Zelle produziert in der Zeiteinheit durchschnittlich dieselbe Quantität der Gärsubstanz.

Wenn wir — bei Anwendung richtiger Methodik — die Erfüllung dieser Voraussetzungen erhalten, können wir den Anteil der Einzelzellen im Verlauf des Vermehrungs- und Gärungsprozesses der Kultur charakterisieren. Auf die Bedeutung solcher Messungen, die zur Abschätzung der Intensität der Entwicklungsfunktion einerseits und der Gärungsfunktion der Mikroorganismen andererseits dienen, haben schon Duclaux (6), Rahn (11), Buchanan (1) und andere hingewiesen. Die beiden letzteren Forscher benutzen zu (1) und (2) analoge Formeln.

In der Literatur ist die Gleichung (1) auch unter folgender Gestalt bekannt:

$$\frac{1}{k} = G = \frac{T \log e}{\log N_T - \log N_O} \quad (3)$$

und sie bestimmt dann die sog. Generationsdauer. Wir finden dort auch dieselbe Gleichung, in der aber an Stelle von log e, log 2 auftritt, was durch Addition der geometrischen Progression erhalten wird. Da es aber kaum annehmbar ist, daß alle Zellen der Bakterienpopulation sich gleichzeitig, „auf Befehl", teilen, so müssen wir erwarten, daß die Anwendung der differenzialen Rechnung richtiger wäre. Die differenziale Gleichung von der Gestalt

$$\frac{d N_t}{d t} = k N_t \quad (4)$$

ergibt nach der Integrierung für die Zeitdauer 0 bis T

$$N_T = N_O e^{kT}, \quad (5)$$

was, nach Auflösung gegen k, die Gleichung (1) ergibt. Die Gleichung (2) wird nach Integrierung der differenzialen Gleichung

$$\frac{d S_t}{d t} = s N_t = s N_O e^{kt} \quad (6)$$

für die Zeitdauer O bis T erhalten.

Wir untersuchten 13 Stämme von Bakterien der Gruppe Strept. lactis in Reinkulturen, die aus Milch und Milchprodukten isoliert wurden. Unsere Untersuchungen bezweckten die Bestimmung der Generationsdauer und gleichzeitig der Säureproduktion von Einzelzellen in der sterilen Milch, wie auch die Charakterisierung des Zusammenhanges zwischen den Funktionen und den Dimensionen der Zellen.

Ausführliche Versuche auf demselben Gebiet, mit Bakterien derselben Gruppe, hat Rahn (11) durchgeführt. Im Gegensatz zur Anordnung der Versuche von Rahn, haben wir nach einer solchen Methodik gearbeitet, die die Anwendung der oben besprochenen Gleichungen rechtfertigen sollte.

II. Anordnung der Experimente.

Die Bestätigung der Voraussetzungen, daß a) die Bakterien sich in der logarithmischen Phase der Zellteilung befinden, b) jede Zelle dieselbe Menge der Säure produziert — ist möglich auf Grund einer solchen Anordnung der Versuchsserien, daß die für bestimmte Stämme charakteristischen Werte von k und s möglichst konstant sind, trotzdem die Zeitdauer T der einzelnen Versuche veränderlich sein kann.

Die Zellen sollen sich in der intensiven Phase der Teilung befinden, gleichzeitig aber soll ein meßbarer Zuwachs an Säure stattfinden. Die Erfüllung dieser Bedingungen hofften wir in der Weise zu erhalten, daß jeder Versuch stets in demselben Augenblick des schnellen Wachstums der Bakterien beendet wurde. Wir fügten nämlich zu den Kulturen eine kleine Dosis von Methylenblau (1 : 200 000) hinzu und die Bestimmung der Säurezunahme, sowie der Endzahl der Zellen, wurde in dem Augenblick der Entfärbung durchgeführt. In einer früheren Arbeit der Verff. (10) wurde gezeigt, daß dem Moment der Entfärbung, eine Zunahme der Milchsäure in Grenzen von 0,3– 0,8$^0/_{00}$ entspricht, was eine schwach hemmende Wirkung auf das Wachstum der Bakterien ausüben soll. Es entspricht gleichzeitig die Entfärbung dem Moment der Erschöpfung des molekularen Sauerstoffs in der Milch. Das Methylenblau ist zwar keine ganz neutrale Substanz (möglich ist eine spezifische Wirkung und ebenso eine Wirkung als Wasserstoffsakzeptor). Eine so kleine Dosis übt aber — wie wir geprüft haben — nur eine schwach hemmende Wirkung aus. Auf diese Weise wurden die Bedingungen des Wachstums und der Gärung der Zellen in bestimmtem Grad ausgeglichen. Durch Aussaat verschiedener Mengen von jungen Kulturen in die sterile Milch, erhielten wir die Entfärbung nach 1—6 Std.

Damit die Zellen sich unmittelbar nach der Impfung in der logarithmischen Phase befinden, ohne, oder mit nur schwachem Einfluß der sog. „lag phase“, haben wir nur sehr aktive Kulturen zur Aussaat angewandt und die Temperatur der Züchtung sowie den Nährboden vor und während der Untersuchung stets identisch gehalten.

Von großer Bedeutung für solche Untersuchungen ist die Methode der Keimzahlbestimmung. Wir haben die mikroskopische Zellzählung in gefärbtem Ausstrichpräparat angewandt. Wenn wir die Einzelzelle als Einheit annehmen, ist es nötig, die Zellen zu berechnen, was — besonders bei Strept. lactis, welcher viele Verbindungen ergibt — nur mikroskopisch ausführbar ist. Wie bekannt, bestimmt die mikroskopische Keimzahlbestimmung alle Zellen, die wirksamen und unwirksamen, sowie eventuell auch die toten. Die Anwendung der jungen, aktiven Kulturen erlaubt anzunehmen, daß die inaktiven Zellen keinen wesentlichen Prozentsatz ausmachen. Wenn diese Erscheinung eine merkbare Rolle spielen würde, müßte eine Reihe von Experimenten bei verschiedener Aussaat der Bakterien und verschiedener Zeitdauer der Züchtung die systematischen Abweichungen der Werte k und s anzeigen.

Wilson (13) und später Buice (3) sind auf Grund eigener Versuche zum Schluß gekommen, daß auch in den jungen Kulturen einiger Bakterienarten inaktive Zellen in ziemlich beträchtlicher Menge auftreten. Man muß jedoch betonen, daß wir die mikroskopische Zählung der Zellen nur mit der Bestimmung der Individuen (nicht Zellen!), die unter gewissen Bedingungen auf gewissen Nährböden wachsen, vergleichen können. Dies beweist nicht, daß der Unterschied zwischen den erhaltenen Zahlen uns die „toten“ Zellen ergibt. Es ist wohl bekannt, daß das Wachstum enden

kann, ehe der Tod eintritt. Und es ist wahrscheinlich, daß diese Unterschiede — abgesehen von den methodischen Einflüssen — zum Teil z. B. nichtwachsende, aber gärfähige Zellen ergeben.

Wie aus dem oben Gesagten folgt, bezweckte die Aufstellung der Versuche die Bestimmung der durchschnittlichen charakteristischen Daten für die Zellen, die sich in einer bestimmten Phase des Wachstums befinden.

III. Methodik.

a) Nährboden. Als Nährboden diente die im Autoklav bei 110° C 15′ lang sterilisierte Magermilch. Die Milch wurde zur Ausführung der Versuche nach 14tägiger Aufbewahrung angewendet, damit der Gehalt an Sauerstoff in der Milch im Gleichgewicht mit der Atmosphäre sei. Eine kurze Charakteristik der Milch gibt uns die Tab. 1 an.

Tab. 1. Charakteristik der angewandten Milch.

pH 18° C	Gesamtsäure in Prozent der Milchsäure	Sauerstoffgehalt bei 30° C in mg pro 100 cm³	Fett %	Spezifisches Gewicht 15/15° C
6,44	0,15	0,7	0,07	1,0345

b) Die Zubereitung von Kulturen. Zwecks Aktivierung der untersuchten Stämme und zum Ausgleich der Bedingungen des Wachstums wurden die Bakterien 5 Tage lang täglich in die Versuchsmilch überimpft, indem täglich die kleine Öse der Ausgangskulturen in die Milch übertragen wurde. Für die Untersuchungen betrug der Säuregrad der Kulturen weniger als 0,3% Milchsäure.

c) Die Temperatur der Versuche schwankte zwischen 28—30° C.

d) Die Keimzahlbestimmung. Zur Bestimmung der Anzahl der Zellen haben wir eine speziell von uns ausgearbeitete Methode der mikroskopischen Zählung im gefärbten Präparat angewandt. Nach der Titration (mit ¼ n NaOH) der Kultur und gründlicher Durchmischung, entnahm man mittels der quantitativen Platinöse der Firma Haag-Streit 1 mm³ der Kultur und strich diese auf 1 cm² Oberfläche des Objektträgers[1]). Die Genauigkeit der Abmessung mittels der erwähnten Öse haben Dorner und Demont (5) als befriedigend gefunden. Wir bereiteten stets zwei parallele Präparate vor. Die bei 120° C während 15′ getrockneten Präparate wurden mit Methylenblau gefärbt und mit Kanadabalsam befestigt. Die Zählung wurde von zwei Beobachtern durchgeführt und die Durchschnittszahl wurde angenommen. Die Genauigkeit unserer Zählung schätzten wir nach den Ergebnissen eines der Verff. (9)

e) Verlauf der Experimente. Die Ausgangskulturen sowie auch die sterile Milch und die sterilen Kölbchen für die Verdünnungen hatten zur Zeit der Versuche die Temperatur von 28—30° C. In die Kölbchen wurden 0, 1, 2, 3, 4 usw. cm³ der sterilen Milch eingeführt. Unmittelbar nachher führte man in jedes Kölbchen soviel der Ausgangskultur ein, daß das ganze Volumen der verdünnten Kultur in jeder Probe genau 10 cm³ betrug. Es wurde also 10, 9, 8, 7 usw. cm³ hinzugefügt. Wir erhielten auf diese Weise bekannte Verdünnungen der Ausgangskultur. Von der Ausgangskultur wurden zwei parallele Ausstrichpräparate vorbereitet. Alle Kölbchen versetzte man mit 0,2 cm³ der 0,025proz. wässerigen Lösung von Methylenblau[2]). Nach guter Mischung stellte man die Kölbchen in dem Brutschrank bei 28—30° C auf. Im Moment der Entfärbung bereitete man die Endpräparate vor, in denen die Anzahl der Bakterienzellen bestimmt wurde. Die Säurezunahme bestimmte man durch Titration. Bei den zwei ersten Stämmen wurden die Bestimmungen der Anzahl der Zellen am Ende der Untersuchung für alle Kölbchen vorgenommen. Bei den übrigen Stämmen bestimmte man diese Anzahl für 5—7 Proben. Es sei bemerkt, daß die ganze Versuchsserie von 20—30 Proben für jeden Stamm in der Zeit von 3—14 Tagen durchgeführt wurde, um sicher zu sein, daß die erhaltenen Zahlen wirklich für den gegebenen Stamm charakteristisch sind.

---

[1]) Die Firma Haag-Streit liefert solche Ösen zur Keimzahlbestimmung nach Burri (4).

[2]) Methylenblau med. (Methylenum coeruleum) Merck.

Tab. 2. Die für die eine Zelle in den einzelnen Proben charakteristischen Zahlen.

Nr. der Probe	$N_O \cdot 10^6$	$N_T \cdot 10^6$	T	S	k	$\frac{1}{k}$	s
			Streptococcus cremoris Nr. 1.				
1	5,2	173,5	5,58	0,788	0,6294	1,59	29,5
2	6,3	267,3	6,00	0,731	0,6254	1,60	17,5
3	11,0	225,6	5,00	0,873	0,6044	1,65	24,6
4	22,0	227,8	4,33	0,844	0,5399	1,85	22,1
5	36,5	251,2	3,00	0,788	0,6429	1,56	23,6
6	44,0	231,0	2,83	0,788	0,5864	1,71	24,7
7	74,4	242,7	1,83	0,653	0,6461	1,55	25,0
8	109,5	218,6	1,33	0,563	0,5197	1,92	26,8
9	109,9	260,0	1,50	0,619	0,5741	1,74	23,5
10	131,9	273,6	1,08	0,563	0,6754	1,49	26,8
			Streptococcus lactis Nr. 2.				
1	0,4	171,1	6,83	0,450	0,8854	1,13	23,3
2	1,2	191,4	6,00	0,450	0,8434	1,19	20,0
3	2,0	209,9	5,57	0,428	0,8335	1,20	17,1
4	4,9	218,4	4,45	0,450	0,8527	1,17	18,0
5	12,1	239,4	3,78	0,428	0,7839	1,28	14,7
6	14,8	247,0	3,77	0,540	0,7461	1,34	17,4
7	16,2	281,2	3,85	0,461	0,7606	1,31	13,2
8	20,2	261,4	3,00	0,338	0,8530	1,17	11,9
9	24,6	205,3	3,00	0,394	0,7077	1,41	15,4
10	35,0	283,6	3,00	0,473	0,6976	1,43	13,3
11	42,4	287,2	2,75	0,495	0,6955	1,44	14,1
12	49,1	291,5	2,45	0,450	0,7266	1,38	13,5
13	69,2	307,8	2,10	0,502	0,7108	1,41	14,9
14	74,1	330,7	1,93	0,450	0,7748	1,29	13,6
15	81,2	289,8	2,00	0,416	0,6361	1,57	12,7
16	143,7	251,7	0,92	0,304	0,6322	1,58	17,8
17	148,3	306,8	1,05	0,338	0,6924	1 44	14,7
18	162,3	295,0	0,92	0,338	0,6557	1,53	16,7
			Streptococcus lactis Nr. 3.				
1	26,6	308,5	3,58	0,371	0,6844	1,46	9,01
2	29,3	337,9	3,58	0,405	0,6829	1,46	8,96
3	53,3	314,4	2,67	0,371	0,6647	1,50	9,45
4	74,3	327,6	2,20	0,338	0,6744	1,48	8,98
5	117,2	373,8	1,67	0,270	0,6944	1,35	7,41
6	148,7	351,0	1,33	0,270	0,6441	1,55	8,60
			Streptococcus lactis Nr. 4.				
1	31,0	526,5	4,17	0,371	0,6791	1,47	5,09
2	62,0	590,4	3,33	0,383	0,6768	1,48	4,90
3	118,4	591,6	2,50	0,236	0,6435	1,55	3,21
4	171,2	540,6	2,00	0,259	0,5750	1,73	4,03
5	236,9	502,4	1,27	0,135	0,5920	1,69	3,01
6	342,4	511,7	0,70	0,113	0,5745	1,74	3,82
			Streptococcus lactis Nr. 5.				
1	9,9	194,8	4,42	0,158	0,6741	1,48	5,74
2	39,6	283,1	3,32	0,236	0,5924	1,69	5,75
3	43,3	281,1	2,92	0,225	0,6406	1,56	6,06
4	65,4	284,9	2,67	0,169	0,5511	1,81	4,23
5	99,1	309,0	2,17	0,169	0,5241	1,91	4,21
6	173,1	344,6	1,17	0,135	0,5886	1,70	4,63
7	180,7	375,8	1,30	0,135	0,5631	1,78	3,90

Tab. 2 (Fortsetzung).

Nr. der Probe	$N_O \cdot 10^6$	$N_T \cdot 10^6$	T	S	k	$\frac{1}{k}$	s
			Streptococcus cremoris Nr. 6.				
1	24,7	283,8	4,08	0,770	0,5982	1,67	18,7
2	30,6	304,4	3,58	0,725	0,6417	1,56	17,9
3	31,8	324,2	3,85	0,826	0,6634	1,51	19,7
4	74,0	317,6	2,25	0,500	0,6474	1,54	14,4
5	76,6	315,3	2,25	0,522	0,6288	1,59	14,8
6	158,9	371,8	1,42	0,635	0,5987	1,67	19,0
			Streptococcus lactis Nr. 7.				
1	32,9	393,8	4,17	0,574	0,5951	1,68	9,46
2	68,7	415,5	3,13	0,506	0,5650	1,77	8,25
3	92,6	540,8	2,95	0,506	0,5982	1,67	6,76
4	137,5	450,5	2,00	0,394	0,5933	1,69	7,46
5	197,3	592,9	2,00	0,506	0,5501	1,82	7,04
6	277,7	645,9	1,62	0,450	0,5212	1,92	6,37
			Streptococcus lactis Nr. 8.				
1	13,8	610,3	6,75	0,596	0,5614	1,78	5,61
2	45,9	516,9	4,75	0,585	0,5097	1,96	6,33
3	75,8	451,3	3,33	0,518	0,5349	1,87	7,37
4	115,2	501,3	2,75	0,495	0,5348	1,87	6,86
5	189,4	580,7	1,92	0,416	0,5835	1,71	6,21
6	345,6	578,4	1,00	0,304	0,5152	1,94	6,72
			Streptococcus lactis Nr. 9.				
1	19,8	325,6	5,58	0,635	0,5017	1,99	10,4
2	66,0	304,5	3,75	0,619	0,4078	2,45	10,6
3	72,3	302,3	3,42	0,450	0,4183	2,39	8,18
4	105,9	368,8	2,57	0,502	0,4856	2,06	9,27
5	158,8	340,2	1,83	0,446	0,4163	2,40	10,2
			Streptococcus lactis Nr. 10.				
1	52,1	376,1	4,50	0,709	0,4392	2,28	8,64
2	112,7	380,6	2,50	0,569	0,4868	2,05	10,3
3	165,0	394,0	1,91	0,506	0,4557	2,19	10,1
4	208,4	460,2	1,67	0,450	0,4743	2,11	8,48
5	225,5	414,1	1,42	0,461	0,4278	2,34	10,5
			Streptococcus lactis Nr. 11.				
1	67,8	421,5	4,58	0,394	0,4084	2,45	4,55
2	75,1	335,1	3,67	0,405	0,4075	2,45	6,35
3	131,4	383,9	2,58	0,338	0,4156	2,41	5,56
4	187,8	431,8	2,00	0,338	0,4162	2,40	5,76
5	203,4	476,9	1,93	0,281	0,4416	2,26	4,54
6	394,3	575,2	1,00	0,225	0,3776	2,65	4,70
			Streptococcus lactis Nr. 12.				
1	110,4	631,4	4,16	0,720	0,4192	2,39	5,79
2	182,0	659,7	2,83	0,439	0,4551	2,20	4,18
3	220,8	692,7	3,08	0,653	0,3711	2,69	5,13
4	310,8	604,7	1,75	0,315	0,3807	2,63	4,08
5	364,0	707,4	1,50	0,259	0,4428	2,26	3,34
			Streptococcus lactis Nr. 13.				
1	57,7	340,8	4,75	0,540	0,3739	2,67	7,13
2	115,4	342,5	3,22	0,495	0,3379	2,96	7,37
3	138,1	430,0	3,05	0,563	0,3733	2,69	7,15
4	226,6	454,5	2,00	0,518	0,3781	2,87	7,90
5	566,5	832,4	1,12	0,563	0,3434	2,91	7,26

N_O = Anfangszahl der Zellen. N_T = Endzahl der Zellen.
T = Zeitdauer der Versuche in Stunden S = Säurezunahme in ‰ Milchsäure.
k = Vermehrungskoeffizient. $\frac{1}{k}$ = Generationsdauer in Std.
s = Stundengärleistung der Zelle in 10^{-10} mg Milchsäure.

IV. Versuchsergebnisse.

Die Tabelle 2 stellt die Ergebnisse der Versuche mit berechneten Werten von 1/k (Generationsdauer) und s (Stundengärleistung) dar. Trotz gewisser Schwankungen der Zahlen, sind sie so konstant bei veränderlicher Zeitdauer, daß man annehmen kann, daß für die einzelnen Stämme die Vermehrungsgeschwindigkeit sowie die Stundengärleistung in gegebenen Umständen in der Tat charakteristisch ist. Die Daten zeigen uns gleichzeitig, am deutlichsten bei Stamm Nr. 2, wo die Zeiten am veränderlichsten sind, daß die beiden Funktionen der Zellen nur in einem bestimmten Zeitabschnitt der Bakterienentwicklung annähernd konstant sind. Wir sehen, daß beide Funktionen die Tendenz einer zunehmenden Intensität bei längerer Zeitdauer aufweisen. Wenn wir das mit der relativ langen Zeit der Generationsdauer vergleichen [Mason (8), erhielt für Strept. lactis in optimalen Bedingungen die Generationsdauer von 25—35′], so müssen wir annehmen, daß in dem angewandten Zeitabschnitt der Kulturentwicklung, die Bakterien sich eher in der nächsten Phase nach der logarithmischen befinden, die nach Buchanan und Fulmer (2) „initial stationary phase“ genannt wird. Die annähernde Beständigkeit des Wertes k findet ihre Erklärung in der relativ kurzen Zeitdauer der Versuche. Wie schon erwähnt, wurden für die Stämme 3—13 außer den Proben mit Bestimmung der Endzahlen der Zellen, noch solche ausgeführt, wo nur die Anfangszahl der Zellen und die Säurezunahme bestimmt wurden. Die verhältnismäßig große Empfindlichkeit der angewandten Methodik tritt deutlich hervor, wenn wir die theoretischen Werte von s_1, für die letzteren Proben berechnen. Nach der Methodik der kleinsten Quadrate finden wir aus der Tabelle 2 die Durchschnittswerte von k und dann s_1, auf Grund der Gleichung:

$$s_1 = \frac{Sk}{N_O\,(e^{kT} - 1)} \qquad (7)$$

Tab. 3. Die auf Grund von Anfangszahl der Zellen und Vermehrungskoeffizient berechneten Stundengärleistungen der Einzelzellen.

Stamm Nr. 3, k = 0,6785				Stamm Nr. 8, k = 0,5436				Stamm Nr. 13, k = 0,3627			
$N_O \cdot 10^6$	T	S	s_1	$N_O \cdot 10^6$	T	S	s_1	$N_O \cdot 10^6$	T	S	s_1
13,3	4,17	0,331	10,59	18,4	6,00	0,585	6,89	28.9	6,17	0,596	8,94
14,7	4,17	0,360	10,43	18,9	5,80	0,569	7,31	56,7	4,83	0,540	7,34
37,2	2,83	0,371	11,63	27,5	5,58	0,563	5,62	113,3	3,28	0,563	7,88
58,6	2,50	0,360	9,36	36,7	4,95	0,563	6,06	173.1	2,83	0,585	6,84
87,9	2,08	0,315	7,84	37,9	5,00	0,574	5,82	230,8	2,13	0,461	6,22
106,6	1,92	0,360	8,55	57,6	4,00	0,567	6,86	276,3	1,97	0,517	6.51
146,5	1,17	0,180	6,88	113,6	2,75	0,506	7,00	288,5	1,75	0,450	6,38
159,8	1,00	0,270	11,80	151,5	2,13	0,450	7,40	339,9	1,50	0,450	6,64
175,7	1,00	0,180	7,16	227,3	1,58	0,394	6,92	346,1	1,58	0,450	6.09
				230,4	1,72	0,383	5,83	453,2	1,33	0,495	6,39
durchschnittlich			**9,36**	303,0	1,25	0,281	5,22	461,5	1,08	0,338	5,53
durchschnittlich aus der Tabelle 2			**8,74**					552,5	1,17	0,563	6,98
				durchschnittlich			**6,45**				
				durchschnittlich aus der Tabelle 2			**6,52**	durchschnittlich			**6,87**
								durchschnittlich aus der Tabelle 2			**7,37**

Als Beispiel geben wir in der Tabelle 3 solche theoretischen Werte s_1 für die Stämme 3, 8 und 13 an. Wie ersichtlich ist, weicht der durchschnittliche theoretische Wert von s_1 sehr wenig von den in der Tabelle 2 gegebenen experimentellen Durchschnittswerten s ab. Für die übrigen Stämme geben wir dieselben durchschnittlichen Werte in der Tabelle 4 an.

Tab. 4. Zahlenwerte der Zellenfunktionen der untersuchten Stämme.

Nummer des Stammes	Generationsdauer $\frac{1}{k}$	Vermehrungskoeffizient k	Stundengärleistung in 10^{-10} mg Milchsäure, berechnet auf Grund von N_O und N_T s	von N_O und k s_1
1	1 h 38′	0,6083	24,4	—
2	1 h 14′	0,8098	15,7	—
3	1 h 28′	0,6785	8,74	9,36
4	1 h 31′	0,6581	4,01	3,98
5	1 h 37′	0,6172	4,93	4,79
6	1 h 39′	0,6071	17,4	17,7
7	1 h 43′	0,5832	7,56	8,63
8	1 h 50′	0,5436	6,52	6,45
9	2 h 12′	0,4536	9,73	10,4
10	2 h 13′	0,4516	9,60	9,48
11	2 h 22′	0,4217	5,24	5,17
12	2 h 25′	0,4134	4,50	4,20
13	2 h 46′	0,3627	7,37	6,87

Die einzelnen Stämme weisen deutliche Schwankungen der beiden Funktionen der Zelle auf. Es ist bemerkenswert, daß unsere Befunde den von Rahn erhaltenen verwandt sind, obwohl die Methodik eine andere ist (Rahn führt die Keimzahlbestimmung mittels des Plattenverfahrens aus, die Temperatur der Versuche ist 21—24° C, die Zeitdauer bis 24 Std.). Der von Rahn erhaltene durchschnittliche Wert, berechnet nach Gleichung (7) mit log e anstatt log 2, beträgt 12.10^{-10} mg, unser durchschnittlicher Wert ist $8{,}46.10^{-10}$. Die Schwankungen für 8 von Rahn untersuchte Stämme betragen $5{,}1.10^{-10}$ bis $22{,}5.10^{-10}$, diejenigen für unsere 13 Stämme $4{,}01.10^{-10}$ bis $24{,}4.10^{-10}$ mg.

V. Der Zusammenhang zwischen Leistungen und Dimensionen der Zellen.

Die biologische Bedeutung des eventuellen Zusammenhangs zwischen Leistungen und Dimensionen der Zellen wurde öfters hervorgehoben, unter anderen ebenfalls von Rahn, sowie von Skar (12). Auf Grund unserer Untersuchungen, in denen die Stämme in möglichst verwandten Bedingungen verglichen werden, können wir nachforschen, welcher Zusammenhang zwischen Leistungen und Größe der Zellen besteht, und zwar berechnet man nach der Multiplikationsmethode die Korrelationskoeffizienten für die Werte k, s und v (v-Zellenvolumen, wie das aus der Tabelle 5 ersichtlich ist).

Man erhält:

$$r_{vs} = +0{,}92 \qquad r_{sk} = +0{,}51 \qquad r_{vk} = +0{,}17$$

Nach Fisher (7) betragen die glaubwürdigen Koeffizienten für 13 Beobachtungen und 11 Freiheitsgrade:

Glaubwürdigkeitskoeffizient . .	0,1	0,05	0,02	0,01
r	0,48	0,55	0,63	0,68

Wir sehen, daß die Koeffizienten die direkte Proportionalität zwischen Größe der Zellen und ihrer Gärleistung bestätigen. Nicht so überzeugend ist die Proportionalität zwischen Gärleistung und Vermehrungsgeschwindigkeit erfüllt. Der Zusammenhang zwischen den Dimensionen der Zelle und ihrer Vermehrungsgeschwindigkeit ist nicht glaubwürdig.

Tab. 5. Vergleich der Dimensionen der Zellen mit ihren Stundengarleistungen.

Nr. des Stammes	Lineare Dimensionen in μ Länge/Breite	Oberflache (als Rotationellipsoid) in μ^2 f	Volumen (als Rotationellipsoid) in μ^3 v	Stunden-garleistung in 10^{-10} mg Milchsäure s	Quotient $\frac{s}{fv}$
1	1,5/1,2	5,32	1,13	24,4	4,06
6	1,4/1,1	4,53	0,89	17,4	4,32
2	1,2/1,1	4,04	0,76	15,7	5,11
9	1,2/1,0	3,58	0,63	9,73	4,31
10	1,2/1,0	3,58	0,63	9,60	4,26
3	1,2/1,0	3,58	0,63	8,74	3,88
7	1,2/1,0	3,58	0,63	7,56	3,35
13	1,2/1,0	3,58	0,63	7,37	3,27
8	1,2/1,0	3,58	0,63	6,52	2,89
11	1,1/1,0	3,36	0,58	5,24	2,67
5	1,1/1,0	3,36	0,58	4,93	2,53
12	1,0/0,9	2,74	0,42	4,50	3,91
4	1,0/0,9	2,74	0,42	4,01	3,48

Die erste Funktion ist so deutlich, daß zwecks ihrer besseren Illustrierung in der Tabelle 5 die Berechnungen der Oberfläche und des Volumens im Vergleich mit den Daten der Stundengärleistung angegeben sind. Die Messungen der in einer 16 stünd. Kultur lebenden Bakterien ergeben selbstverständlich nur annähernde Ergebnisse, jedoch ist es interessant, daß die Stundengärleistung proportional einer hohen Potenz der linearen Dimension der Zelle ist, weil erst der Quotient: Stundengärleistung zum Produkt, Oberfläche durch Inhalt, relativ verwandte Zahlen gibt. Für drei Werte können wir, wie bekannt, den sog. Partiellkorrelationskoeffizient berechnen, der den Zusammenhang zwischen zwei Werten, nach Beseitigung des dritten, charakterisiert. Die Ergebnisse der Berechnung solcher Koeffizienten sind folgende:

$$r_{vs \cdot k} = +0,98 \qquad r_{ks \cdot v} = +0,92 \qquad r_{vk \cdot s} = -0,89$$

Der nach dem Punkt angegebene Wert betrifft den eliminierten Faktor.

Die Abschätzung der Glaubwürdigkeit nach Fisher gibt uns:

(für 10 Freiheitsgrade):

Glaubwürdigkeitskoeffizient . .	0,1	0,05	0,02	0,01
r	0,50	0,58	0,66	0,71

Wir erhalten sehr interessante Daten. Die Koeffizienten der beiden noch vorher glaubwürdigen Funktionen sind nämlich jetzt noch höher, dagegen ist die Funktion Zellenvolumen-Vermehrungsgeschwindigkeit deut-

lich negativ: den größten Zellen, wenn sie (theoretisch) dieselbe Gärleistung aufweisen, entspricht die langsamere Teilung. Ähnliche Ergebnisse haben wir in unserer früheren Arbeit erhalten (10), beim Vergleich der Intensität der Wasserstoffaktivierung, Vermehrungsgeschwindigkeit und des Volumens der Zellen für dieselben Stämme. Die Partiellkorrelationskoeffizienten weisen, ähnlich wie hier, direkte Proportionalität zwischen enzymatischer Funktion und Vermehrungsgeschwindigkeit, sowie zwischen enzymatischer Funktion und Volumen der Zellen, dagegen umgekehrte Proportionalität zwischen Volumen und Vermehrungsgeschwindigkeit auf. Wegen der relativ kleinen Anzahl von Beobachtungen, obwohl sie biologisch verständlich sind, erfordern die Ergebnisse eine Bestätigung auf Grund größeren Materials.

Zusammenfassung.

Auf Grund einer Methodik, in welcher der biologische Zustand der untersuchten 13 Stämme von Strept. lactis möglichst sorgfältig ausgeglichen war, wurden die Generationsdauer und die Stundengärleistung der Einzelzelle als Durchschnittszahlen von vielen Parallelversuchen bestimmt. Die Versuche führen uns zum Schluß, daß bei Säurezunahme in den Grenzen von 0,3—0,8$^{0}/_{00}$ der Milchsäure, die Bakterien sich in der nächsten nach der logarithmischen Phase, nämlich in der „initial stationary phase" der Zellteilung befinden. Die Generationsdauer für einzelne Stämme schwankt von 1 h 14′—2 h 46′, die Stundengärleistung von $4{,}01.10^{-10}$—$24{,}4.10^{-10}$ mg der Milchsäure. Zwischen dem Volumen der Zelle und der Gärleistung, sowie zwischen der Vermehrungsgeschwindigkeit und der Gärleistung erhält man direkte Proportionalität, dagegen erhält man nach Beseitigung des Einflusses der Gärleistung (Partiellkorrelationskoeffizient), zwischen der Vermehrungsgeschwindigkeit und dem Volumen der Zelle deutlich umgekehrte Proportionalität.

Literatur.

1. Buchanan, R. E., Abstr. Bact. Vol. 2. 1918. p. 11. — 2. Buchanan, R. E., and Fulmer, E. I., Physiology and Biochemistry of Bacteria, 1. London 1928. — 3. Buice, W. A., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 89. 1933/34. S. 387. — 4. Burri, R., The Quantitative Smear-Culture, a Simple Means for the Bacteriological Examination of Milk, World's Dairy Congress. 1928. — 5. Dorner, W., et Demont, P., Le Lait. T. 11. 1931. p. 909. — 6. Duclaux, E., Traité de Microbiologie. T. 4. 1901. p. 328. — 7. Fisher, R. A., Statistical Methods for Research Workers. London 1930. — 8. Mason, M. M., Journ. of Bact. Vol. 29. 1935. p. 103. — 9. Matuszewski, T., Medyc. Dośw. i Społ. T. 18. 1934. z. 5/6. — 10. Matuszewski, T., Neyman, J., Pijanowski, E., Supińska, J., Le Lait. T. 15. 1935. p. 1057. — 11. Rahn, O., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 32. 1912. S. 375. — 12. Skar, O., Die Reduktaseprobe. Intern. Milchwirtsch.-Kongreß. 1931. Vortr. 2. Sektion, Deutsche Ausgabe, S. 58. — 13. Wilson, G. S., Journ. of Bact. Vol. 7. 1922. p. 405.

Nachdruck verboten.

Bacillus alvei and Bacillus para-alvei.

[Rothamsted Experimental Station, Harpenden, Herts.]

By **H. L. A. Tarr.**

With 6 figures in the text.

Bacillus alvei was first described by Cheshire and Cheyne (1). Recently the writer studied a number of strains of this organism obtained from different sources in detail, and found that although most of their characteristics were identical, their fermentation reactions were by no means consistent (7). Burnside has recorded the isolation of an organism termed Bacillus para-alvei from affected larvae obtained from colonies of bees suffering from a disease which he has named "Parafoulbrood" (2, 4). From his description of B. para-alvei (3) it is not quite clear how this organism can be distinguished from B. alvei, and the writer has therefore compared these species, the present article being a brief record of the results obtained.

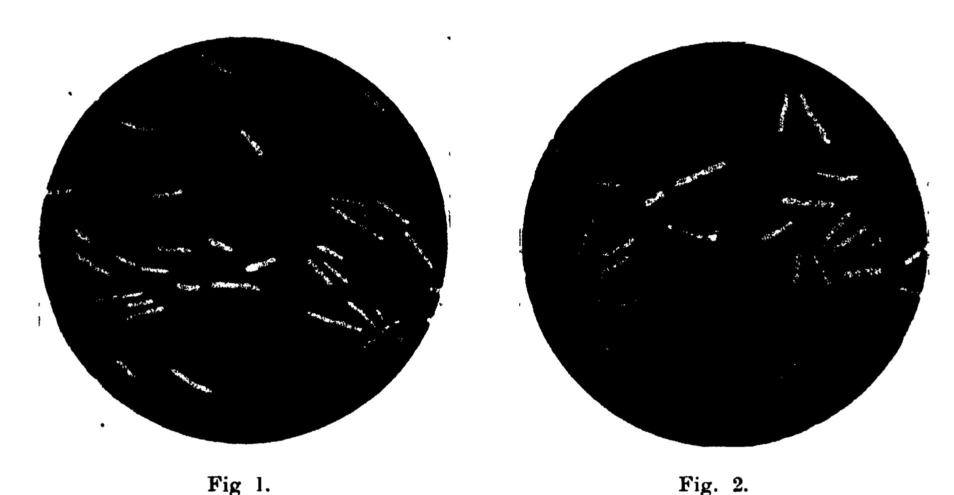


Fig 1. Fig. 2.

Fig. 1. B. alvei after 16 hours' growth on egg agar. × 1200

Fig. 2. B. para-alvei after 16 hours' growth on egg agar. × 1200.

The strain of B. alvei used was that employed in certain experiments dealing with the production of so-called "European foul brood" (8). Dr. Lochhead kindly supplied the strain of B. para-alvei. This culture was originally obtained from Dr. Hambleton of the Bee Culture Laboratory, Washington, in 1933. The methods employed in the study of these organisms were essentially the same as those followed during the investigation of various strains of B. alvei (7), the fermentation reactions being carried out by the technique to be described in a forth-coming paper (8). The following results have been obtained.

The only variation so far noted between the two species is a purely morphological one. Both are spore forming organisms and are motile by

means of peritrichous flagella. They are Gram positive in very young cultures, but the cells rapidly lose their power to retain this stain and in old cultures most of the cells are Gram negative. Vegetative cells of approximately the same size are formed after 16 hours' growth at 35° C. on Hartley's beef digest agar (5). These cells are practically indistinguishable, but there is a somewhat greater tendency for the cells to be more pointed and slightly curved in the case of B. alvei, while in case of B. para-alvei the cells are usually rounded at the ends. A rather similar appearance results when these organisms are cultivated for 16 hours on egg agar (6) (Fig. 1 and 2). After 36 hours' growth on egg agar the difference between the two species is accentuated (Fig. 3 and 4). Thus in the case of B. alvei the vegetative cells become long and quite pointed at the extremities, the spores being formed near one end of the cell. Normally there is no swelling at the site of sporulation, and frequently a slight restriction appears (Fig. 3). In the case



Fig. 3.

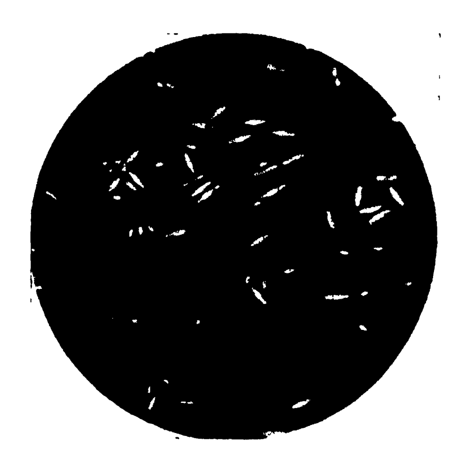


Fig. 4.

Fig. 3. B. alvei after 36 hours' growth on egg agar. × 1200.
Fig. 4. B. para-alvei after 36 hours' growth on egg agar. × 1200.

of B. para-alvei under similar conditions the rods are smaller, more rounded at the extremities, and the spores are formed more nearly centrally, there being a definite swelling at the site of sporulation (Fig. 4). The appearance of the free spores formed by these organisms is shown in Fig. 5 and 6. In the case of both species the peculiar chain like arrangement of the free endospores first noticed in the case of B. alvei by Cheshire and Cheyne (1) is evident. However, the spores formed by B. alvei (Fig. 5) are approximately twice as long as they are broad, while those formed by B. para-alvei are oval in shape (Fig. 6). This fact has been noticed by Burnside (private communication). Morphologically, then, these two species are not identical.

In all its general cultural and biochemical characteristics the strain of B. para-alvei examined gave reactions identical with those obtained in the case of B. alvei strains (7). It formed acid from starch, dextrin, raffinose, sucrose, maltose, glucose, fructose, mannose, inositol, adonitol, glycerol, and salicin, but not from inulin, lactose, galactose, arabinose, xylose, mannitol or erythritol. Thus it closely resembled the two Eng-

lish strains of B. alvei studied by the writer (7) with respect to its fermentative power, differing only in its ability to ferment fructose. Thus the only difference so far noticed between B. alvei and B. para-alvei is a purely morphological one.

Summary.

Bacillus alvei can be distinguished from Bacillus para-alvei by the change in shape of the vegetative cells during sporulation, and by the type of endospore produced. In other respects the organisms are identical.

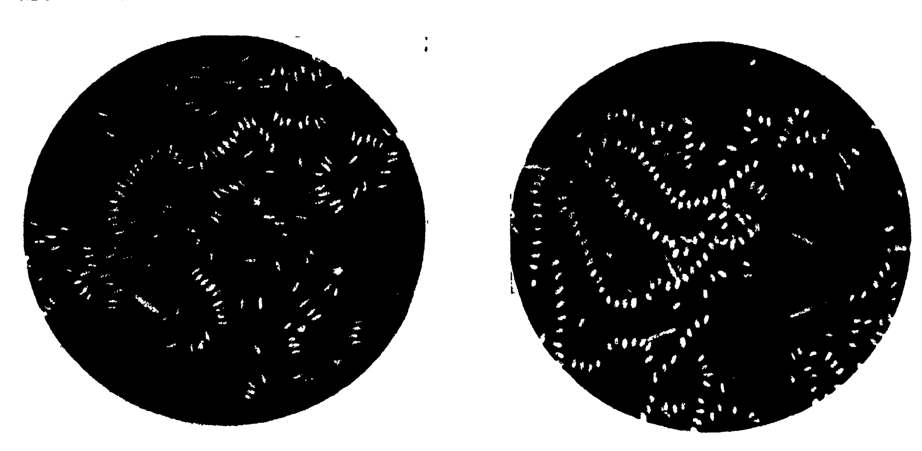


Fig. 5. Fig. 6.

Fig. 5. B. alvei after 5 days' growth on egg agar. × 1200.
Fig. 6. B. para-alvei after 5 days' growth on egg agar. × 1200.

References.

(1) Cheshire, F. R., and Cheyne, W. W., The pathogenic history and history under cultivation of a new bacillus (B. alvei), the cause of the disease of the hive bee hitherto known as foul brood. (Journ. roy. Micro. Soc. Ser. 2. Vol. 5. 1885. p. 581.) — (2) Burnside, C. E., A newly discovered brood disease. (Amer. Bee. J. Vol. 72. 1932. p. 433.) — (3) Burnside, C. E., and Foster, R. E., Studies on the bacteria associated with parafoulbrood. (Journ. econ. Ent. Vol. 28. 1935. p. 578.) — (4) Foster, R. E., and Burnside, C. E., Parafoulbrood. (Glean. Bee Cult. Vol. 61. 1933. p. 86.) — (5) Hartley, B., and Hartley, O. M., Cited in A System of Bacteriology. Vol. 9. 1931. p. 60. (Med. Res. Coun., London.) — (6) Sturtevant, A. P., The relation of commercial honey to the spread of American foul brood. (Journ. agric. Res. Vol. 45. 1932. p. 257.) — (7) Tarr, H. L. A., Studies on European foul brood of bees. I. A description of strains of Bacillus alvei obtained from different sources, and of another species occurring in larvae affected with this disease. (Ann. app. Biol. Vol. 22. 1935. p. 709.) — (8) Tarr, H. L. A., Studies on European foul brood of bees. II. The production of the disease experimentally. (Ann. app. Biol. Vol. 23. No. 3. 1936.)

Ein neues Gärröhrchen und Gärfläschchen für die Bestimmung des Gärvermögens von aeroben und anaeroben Mikroorganismen.

[Aus dem Bakteriologischen Laboratorium der „N. V. Nederlandsche Gist- en Spiritusfabriek" in Delft (Holland).]

Von **A. P. Struyk.**

Mit 1 Abbildung im Text.

Bei der Bestimmung von Gasbildung aus gewissen Zuckerarten durch Mikroorganismen stößt man bei den üblichen Gärgefäßen manchmal auf Schwierigkeiten. Es ist ein wichtiges Kennzeichen bei den Mikroben, ob eine Zuckerart vergärbar ist oder nicht. Als Beispiel diene, daß manche Zuckerarten von den verschiedenen Hefearten, unter Bildung von Kohlensäure, vergärt werden andere nicht. Weiter seien erwähnt die homofermentativen Milchsäurebakterien, die aus Glukose nur Milchsäure bilden, aus der von den heterofermentativen Bakterien außerdem noch Gas, d. h. Kohlensäure, produziert wird. Es können weiter noch viele andere Beispiele von Gasbildung aus Zuckerarten durch Mikroben erwähnt werden, wobei diese Eigenschaft als physiologisches Merkmal gelten kann. Das entwickelte Gas stellt nicht immer nur Kohlensäure dar, sondern daneben kann auch Wasserstoff vorkommen.

Die im bakteriologischen Laboratorium meist üblichen Gärgefäße sind:

1. das Gärkölbchen nach Einhorn[1];
2. das Gärröhrchen nach Durham[2];
3. das geschlossene Stöpselfläschchen[3].

Jedem der genannten Gefäße haften jedoch unter gewissen Umständen einige Nachteile an. Bevor dieselben erörtert werden, will ich das von mir projektierte Gefäß behandeln, um nachher ihre Eigenschaften beiderseitig zu vergleichen.

Das Gefäß A, nach nachstehender Abbildung, setzt sich zusammen aus einem Röhrchen von etwa 10 cm Länge, mit einem sehr gut passenden Schliff (etwa 2 cm lang), in welchen ein zweites Röhrchen (Oberröhrchen) paßt, das in einen verengten Teil ausgezogen ist. Letzterer ist etwa 5 cm lang und steckt im Unterröhrchen, wobei das Oberröhrchen etwa 8,5 cm über den Schliff hinausragt. Der Durchmesser der Öffnung am Ende des verengten Teiles soll nicht kleiner sein als 2 mm. Es werden Gärröhrchen verwendet mit einem Inhalt von etwa 10 und 15 ccm.

Das Oberröhrchen wird mit einem Wattestopfen versehen, wonach das ganze Gefäß — also mit den Schliffen aufeinander — im Heißluft-Sterilisator trocken sterilisiert werden kann. Auch das Unterröhrchen, mit Flüssigkeit gefüllt und mit dem Oberröhrchen gut angeschlossen, kann auch im Dampftopf oder Autoklav sterilisiert werden. Wenn sich hierbei Dampf-

---

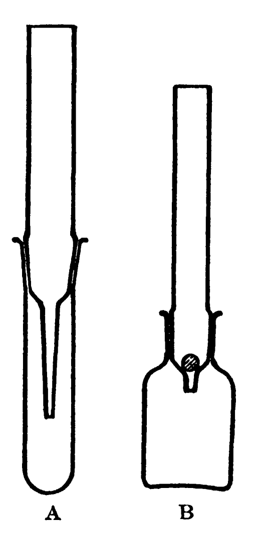
[1]) In der amerikanischen Literatur werden diese Kölbchen oft als Gärkölbchen nach Th. Smith bezeichnet. Dies ist nicht ganz richtig (vgl. N. M. Stelling Dekker, Die sporogenen Hefen. Amsterdam [Drukkerij „Holland"] 1931. S. 14).

[2]) Dieses Röhrchen besteht bekanntlich aus einem kleinen Reagenzglas (75 × 10 mm), welches umgekehrt in ein größeres, normales Reagenzglas gestellt wird.

[3]) Diese Fläschchen werden wenigstens in Holland vielfach in bakteriologischen Laboratorien, z. B. in Wasserleitungsbetrieben, benutzt.

blasen im Unterröhrchen bilden, wird ein Teil der Flüssigkeit daraus in das Oberröhrchen hineingedrückt. Bei richtiger Konstruktion kann alle heraufgedrückte Flüssigkeit in dem Oberröhrchen aufgefangen werden. Es kommt zwar vor, daß die Flüssigkeit im Autoklav derartig in Bewegung kommt, daß sie den Wattestopfen berührt; dieses Übel braucht jedoch nicht aufzutreten, wenn vorsichtig sterilisiert und der Druck nur langsam verringert wird. Die Öffnung des verengten Röhrchens dürfte hierbei eine Rolle spielen, weshalb der Durchmesser nicht kleiner sein soll als 2 mm.

Manchmal findet man sofort nach der Sterilisation eine Luftblase im Unterröhrchen, welche allmählich verschwindet und von der bei der Füllung in der Flüssigkeit gelösten Luft herrührt. Wenn man aber heiß füllt, d. h. mit ausgekochter Flüssigkeit, so ist diesem Übel abgeholfen. Es empfiehlt sich stets, die Flüssigkeit eine kurze Zeit auszukochen, bevor die Füllung des Unterröhrchens stattfindet — auch wenn nicht im Autoklav nachsterilisiert wird. Wenn nämlich die geimpften Röhrchen bei einer höheren Temperatur bebrütet werden als diejenige, bei der sie gefüllt worden sind (z. B. 37° und 50° C), so läßt sich schon bald eine Entweichung von gelöster Luft wahrnehmen. Dies könnte dann zu Verwechselung mit Gärungsgas führen.



Die Füllung des Röhrchens ist auf ziemlich einfache Weise steril vorzunehmen. Dabei ist wie folgt zu verfahren:

Das Röhrchen ist am besten schräg in ein kleines Becherglas zu stellen. Man hebt mit einer Hand das Oberröhrchen ein wenig auf und gießt mit der anderen Hand die Flüssigkeit in das Unterröhrchen, welch letzteres nachher mit dem Oberröhrchen gut abgeschlossen wird. Man soll hierbei Sorge tragen, daß keine Luftblase eingeschlossen wird. Die Schliffe werden gegenseitig drehend angezogen, so daß dieselben ohne Drehung schwer zu lösen sind. Wenn das Lösen nachher nicht glatt vonstatten geht, ist ein leichtes Erwärmen zu empfehlen.

Sollte der Schliff nicht gut passend ausgeführt sein, so kann es geschehen, daß die Flüssigkeit dem Schliffe entlang aus dem Unterröhrchen verdampft. Nach einiger Zeit wird dann die Flüssigkeit aus dem Oberröhrchen hineingezogen, was verhütet werden soll.

Es können ohne Mühe einige Röhrchen zusammen in einen Glaszylinder gestellt werden (gleich wie Reagenzgläser). Wenn mit pathogenen Mikroben gearbeitet wird, kann man die Röhrchen in einen Glaszylinder stellen, welcher dann noch mit einem Deckel zu verschließen ist.

Bei der Impfung wird ein Klümpchen Bakterienmaterial in das verengte Röhrchen gebracht. Dieses Klümpchen haftet teilweise an der Wand des Röhrchens und fällt andernteils herunter in das Unterröhrchen, d. h. in den eigentlichen Gärraum. An jener Stelle im Röhrchen, wo die Sauerstoffspannung am geeignetsten ist, wird die Entwicklung am schnellsten auftreten. Die Mikroben können entweder durch die Schwerkraft oder durch eigene Bewegung in das Unterröhrchen gelangen, und falls dieselben über Gärvermögen verfügen, wird sich das gebildete Gas unterhalb des Schliffes auffangen lassen. Dies geschieht jedoch nur, wenn die Flüssigkeit mit diesem Gas gesättigt ist.

Wegen des verengten Röhrchens wird das gelöste Gas nur sehr langsam mit der freien Luft in Verbindung treten, so daß nur ein sehr geringer Verlust durch Diffusion auftritt. Dies ist ein wichtiger Punkt, in dem es sich von anderen Gärgefäßen günstig unterscheidet.

Schreiten wir jetzt zu einem Vergleich mit den anderen obenerwähnten Gärgefäßen.

1. Wir nehmen zuerst den Fall einer geringen oder langsamen Gärung an, wie er sich bei den heterofermentativen Milchsäurebakterien in Hefewasser-Glukose-Lösung zeigt. Die Möglichkeit ist dann groß, daß im Einhorn-Kölbchen, sowie im Durham-Röhrchen keine Kohlensäurebildung auftritt. Das langsam gebildete Gas kann nämlich sehr leicht vom offenen Schenkel, resp. Reagenzglas, hinausdiffundieren und auf diese Weise der Beobachtung entzogen werden. Das Stöpselfläschchen wird tatsächlich Gas aufweisen, aber es muß zuerst ein bestimmter Überdruck erreicht werden, um den Stöpsel etwas zu heben. Dadurch wird aber auch zugleich die Beobachtung der gebildeten Gasmenge ungenau.

Weil der Gaswechsel nur durch das verengte Röhrchen stattfinden kann, wird das von mir beschriebene Gärröhrchen das entwickelte Gärungsgas schwer herausdiffundieren lassen. Das Freiwerden des Gases im Unterröhrchen kann früher beobachtet werden als bei den anderen Gärgefäßen. Ich habe dies mehrere Male bei Betabacterium breve und Betacoccus arabinosaceus in Hefewasser + 2% Glukose feststellen können[1]). Nach 4täg. Bebrüten bei 30° C hatte sich eine deutlich wahrnehmbare Menge Gärungsgas gebildet, im Einhorn-Kölbchen — auch beim längeren Bebrüten — dagegen nicht.

2. Ein zweiter Vergleichspunkt ist die Beobachtung der gebildeten Gasmenge, sowie eine Untersuchung über die Anwesenheit von Wasserstoff neben Kohlensäure, wie z. B. bei den Bakterien der Coli-Aerogenes-Gruppe. Im letzten Falle soll das Verhältnis dieser zwei Gase leicht festgestellt werden können. Für ein quantitatives Auffangen des Gärungsgases ist keines der genannten Gefäße geeignet. Auch bei unserem Gärröhrchen wird während der Gärung das Volumen der gasproduzierenden Flüssigkeit immer kleiner. Man kann allerdings einen ziemlich guten Überblick bekommen über die Geschwindigkeit der Gasbildung, auch kann festgestellt werden, ob viel oder wenig Gas entwickelt wurde. Die Stöpselflasche versagt, wie schon erwähnt, in diesem Falle.

Was nun die Messung des Verhältnisses Wasserstoff : Kohlensäure anbelangt, sind Einhorn-Kölbchen, Durham-Röhrchen und unser Gärröhrchen nahezu gleichwertig. Bei allen ist dies leicht festzustellen. Beim Gärröhrchen bringt man ein wenig konzentrierte Lauge in das Oberröhrchen, schüttelt dasselbe vorsichtig in schräger Stellung, wobei die Lauge in das Unterröhrchen gelangt und die Kohlensäure vom Gärungsgas absorbiert wird. Man hat nun den Vorteil, daß CO_2-Verluste infolge Diffusion wesentlich beschränkter sind als bei den anderen Gefäßen.

3. Wird nur sehr wenig Gas gebildet oder ist gar kein freies Gas zu beobachten, so kann immer noch untersucht werden, ob Gärungsgas in gelöstem Zustande vorhanden ist. Dazu hebt man das Oberröhrchen ab und

[1]) Diese Bakterienkulturen erhielt ich durch die freundliche Vermittlung des Herrn Prof. Dr. A. J. Kluyver aus der Sammlung des Laboratoriums für Mikrobiologie der Technischen Hochschule in Delft. Ich möchte ihm hier meinen besten Dank dafür aussprechen.

gießt schnell einen Teil der Flüssigkeit des Unterröhrchens aus. Diese Flüssigkeit wird also durch Luft ersetzt. Man schließt dann wieder schnell mit dem Oberröhrchen ab. (Das Niveau der Flüssigkeit soll höher sein als die Öffnung am Ende des verengten Röhrchens.) Beim vorsichtigen Schütteln des geschlossenen Gärröhrchens wird ein Teil des gelösten Gärungsgases in die überstehende Luft übergehen. Durch diesen Gasaustritt wird die Flüssigkeit in dem verengten Röhrchen höhersteigen, was sehr gut zu beobachten ist. Außerdem kann man beim Entweichen von Kohlensäure nachher noch mit Lauge absorbieren, wobei das ursprüngliche Volumen der zugelassenen Luftmenge wieder erreicht werden kann.

Im Einhorn-Kölbchen kann das gelöste Gas auch auf diese Weise beobachtet werden, jedoch wird das langsam gebildete Gärungsgas, wenn Gasblasen nicht entstanden sind, im allgemeinen durch den offenen Schenkel hinausdiffundiert sein.

4. Betrachten wir den Fall, in dem die Mikroorganismen anaerob sehr gut gären können, jedoch für eine gute Entwicklung einen bestimmten Sauerstoffdruck brauchen (z. B. die verschiedenen Hefearten). Wachstum ist notwendig, damit eine genügende Menge Zellmaterial in den Gärraum geliefert werde. Dies ist nämlich ein wichtiges Merkmal des Einhorn-Kölbchens, was sich jedoch auch bei unserem Gefäß bewährt hat. Impft man also in das verengte Röhrchen, so wachsen die Organismen in und oberhalb der Verengung. Nach und nach geraten dieselben dann in das Unterröhrchen, wo das Gärungsgas aufgefangen werden kann. Bei Saccharomyces cerevisiae, z. B. in Hefewasser + 2% Glukose, kann dies sehr leicht beobachtet werden. Das geschlossene Stöpselfläschchen ist hierzu selbstverständlich unbrauchbar.

5. Wollen wir die Vergärung von Zuckerarten durch anaerobe Mikroorganismen behandeln. Es wäre zu erwarten, daß dieselbe im Gärröhrchen beobachtet werden könnte, denn der Sauerstoff kann schwer — und zwar nur durch das verengte Röhrchen — hereindringen. Weiter geraten die meisten Bakterien auf den Boden, sind also möglichst weit von der Luftoberfläche entfernt. Dies ist gerade nicht der Fall beim Einhorn-Kölbchen. Es ergab sich tatsächlich bei unserem Gärröhrchen, daß Sporenmaterial von Butylbakterien nach einem Tage eine sehr gute Gasentwicklung in Hefewasser-Glukose und Peptonwasser-Glukose aufwies.

Was den Lufteintritt anbelangt, so ist derselbe durch Sterilisation des gefüllten Gärröhrchens mit ausgekochtem Glukose-Hefewasser, vermischt mit ein wenig Methylenblau zu beobachten. Es entsteht dann durch Reduktion Leuko-Methylenblau. Nur in dem oberen Teil der Verengung bleibt das Methylenblau in der oxydierten Form. Langsam sinkt jetzt die Blaufärbung und gelangt schließlich auch in das Unterröhrchen. Dies beansprucht jedoch einige Tage. Im Vergleich mit dem üblichen Reagenzglas, gefüllt mit Hefewasser + 2% Glukose und einer kleinen Menge Leuko-Methylenblau sehen wir ganz genau, daß eine Vermischung der oberen Schichten mit den sich darunter befindlichen im Gärröhrchen sehr schwer stattfindet. Doch empfiehlt es sich m. E., der Abschließung des Lufteintritts noch etwas entgegenzukommen. Dies kann sehr leicht vorgenommen werden durch Anbringung eines Glaskügelchens in dem verengten Röhrchen. Weil dasselbe ziemlich fest liegt, bekommt man auf diese Weise tatsächlich einen geeigneten Abschluß.

Dieses Prinzip wurde auch schon von I. C. Hall gefunden. Er hat dasselbe nämlich zur Anwendung gebracht bei seinen anaeroben Kulturgläsern mit Marbelverschluß[1]).

Es ist dafür Sorge zu tragen, daß das Kügelchen nicht zu groß ausfällt und leicht von der Öffnung entfernt werden kann zum bequemen Durchlaß der Platinnadel usw.

Bei der Probe mit Hefewasser + 2% Glukose und Leuko-Methylenblau zeigt es sich, daß viele Tage nötig sind, bevor die Blaufärbung aus dem Oberröhrchen in das Unterröhrchen gelangt. Hierbei werden die üblichen runden Glaskügelchen benutzt (etwa 5 mm im Durchmesser). Ein Teil des verengten Röhrchens kann ringsum matt geschliffen werden zum besseren Abschluß desselben mittels des Kügelchens.

Es sei noch darauf hingewiesen, daß sich bei unserem Gärröhrchen die Luft leicht auskochen läßt. Man füllt dazu das Unterröhrchen — um dem Stoßen vorzubeugen — zuerst mit ein wenig sterilem Sand und nachher mit heißer Flüssigkeit, bis dasselbe fast voll ist. Die Flüssigkeit kann nunmehr ohne Beschwerde über einer kleinen Gasflamme ausgekocht werden. Alsdann füllt man das Röhrchen nochmals vorsichtig mit ein wenig ausgekochter Flüssigkeit und schließt dasselbe mit dem Oberröhrchen ab, worin sich das Glaskügelchen befindet. Nach der Füllung kann man das Röhrchen, wenn nötig, im Autoklav sterilisieren. Man kann die Füllung jedoch nach einiger Übung auch steril vornehmen. Man hält mit der Zange in der einen Hand das fast ganz gefüllte und verschlossene Röhrchen über der Gasflamme. Mit der anderen Hand hebt man das Oberröhrchen ein wenig auf, um beim Kochen die Dampfblasen entweichen zu lassen. Nach dem Auskochen schließt man das Unterröhrchen ab, stellt dasselbe in ein kleines Becherglas und öffnet abermals, um mit ausgekochter Flüssigkeit nachzufüllen, bis das Unterröhrchen ganz voll ist, wonach man es wieder gut abschließt. Nach dem Abkühlen ist das Gärröhrchen fertig zur Impfung.

Die Möglichkeit zum Auskochen der Luft scheint nur ein weiterer Vorteil zu sein gegenüber dem Stöpselfläschchen. Das Durham-Röhrchen in einem Vakuum-Exsiccator entspricht nur mäßig den gestellten Anforderungen, weil das gebildete Gas sich dabei zu stark abzeichnet und bei Öffnung des Vakuum-Exsiccators auf ein sehr kleines Volumen reduziert wird, welches nicht analysierbar ist.

Ich konnte z. B. im Gärröhrchen beobachten, daß bei schwacher Impfung eines alten an der Luft aufbewahrten Nährbodens mit Sporen enthaltenden Kolonien des anaeroben Bakteriums Clostridium acetobutylicum, nach einem Tage in Peptonwasser + 2% Glukose, eine sehr deutliche Gärung eingetreten war. Es ist also möglich, mit diesem Gärröhrchen die Vergärbarkeit von Zuckerarten mittels anaerober Bakterien festzustellen, ohne Anwendung eines Vakuum-Exsiccators.

Das vorliegende Gärröhrchen hat weiter den Vorteil, daß während der Gärung eine Probe mit einer Pasteurschen Pipette entnommen werden kann, ohne daß die Luft Zutritt bekommt, um z. B. den Zustand der Bakterien unter dem Mikroskop zu beobachten. Das Röhrchen kann selbstverständlich gleichfalls zur Anwendung gelangen für anaerobe Kultivierung im allgemeinen, also in Medien, in denen keine Gasentwicklung auftritt.

6. Schließlich kann das Gefäß dazu dienen, um zuckervergärende oder nicht vergärende anaerobe bzw. fakultativ anaerobe Mikroorganismen an-

[1]) Hall, I. C., Journ. Inf. Dis. Vol. 29. 1921. p. 317.

zureichern. Die erwähnten Bakterien können neben obligat aeroben Organismen im Ausgangsmaterial anwesend sein. Dieselben werden sich alsdann wie die fakultativ anaeroben Organismen im Oberröhrchen entwickeln und zwar hauptsächlich oberhalb des Glaskügelchens, während die anaeroben und fakultativ anaeroben sich im Unterröhrchen anhäufen können. Gegebenenfalls kann gleichzeitig die Gasbildung beobachtet werden. Im Gegensatz zum Stöpselfläschchen — dessen Stöpsel vielfach abspringt — bleibt das Gärröhrchen während der Anreicherung intakt. Wünscht man die anaeroben Bakterien zu isolieren, so entfernt man das mit Flüssigkeit gefüllte Oberröhrchen, und stellt aus dem Inhalt des Unterröhrchens eine Plattenkultur her. In dieser Weise gelingt es z. B. sehr gut, Buttersäure- und Buthylalkoholbakterien aus Gartenerde, Mais und dergl. anzureichern und zu isolieren.

Meiner Meinung nach bildet dieses Gärgefäß gleichfalls Vorteile für die bakteriologische Wasseruntersuchung. Es indiziert die Gasbildung in Laktosebouillon durch Bakterien der Coli-Aerogenes-Gruppe besser als bei Verwendung des Stöpselfläschchens und zwar aus dem bereits unter 1 genannten Grunde.

Ich habe einige Male verschiedene Konzentrationen von Oberflächenwasser in Laktosebouillon untersucht und erhielt nach positiver Gasbildung beim Abstreichen aus dem Inneren auf Eosin-Methylenblau-Laktoseplatten ganz gute Kolonien des Coli- und Aerogenes-Typus. Man kann also in diesem Falle — im Gegensatz zum Einhorn-Kölbchen und Durham-Röhrchen — die anaeroben und fakultativ anaeroben Bakterien gesondert von den aeroben Organismen kultivieren. Auch bei diesen Anreicherungen soll das Glaskügelchen benutzt werden, damit möglichst wenig der obligat aeroben Bakterien in den Unterraum gelangen. Zwar werden sie dort nicht wachsen, doch ebensowenig absterben und bei späterer Abimpfung störend wirken.

Es sei jedoch bemerkt, daß das Glaskügelchen keinen bakteriendichten Verschluß gewährleistet. Es ist möglich, daß oberhalb des Kügelchens entweder durch die Luft oder durch die Stoffwechselprodukte aerober Organismen eine schnellere Entwicklung der fakultativ anaeroben Bakterien stattfindet als im Inneren des Röhrchens. Diese Bakterien können dann an dem Kügelchen entlang in den Unterraum gelangen, die Bakterienzahl dort stark vermehren und demzufolge eine frühere und schnellere Gasbildung hervorrufen. Ich möchte in diesem Zusammenhang darauf hinweisen, daß es also nicht notwendig ist, daß das Stöpselfläschchen und Gärröhrchen nach bestimmter Zeit die gleiche Flora aufweisen. Um dies feststellen zu können, sollten zahlreiche Versuche nebeneinander angestellt werden.

Beim Gärröhrchen kann das zu kleine Volumen bei manchen Anreicherungen nachteilig sein. Für diesen Fall ist ein sog. Gärfläschchen konstruiert worden (siehe Fig. B). Der Inhalt desselben beträgt etwa 35 ccm, der verengte Teil des Aufsatzröhrchens ist derartig kurz (etwa 1 cm), daß die weggedrückte Flüssigkeit auch hier in diesem Röhrchen aufgefangen werden kann. Dieses Rohr ragt etwa 9 cm über den Rand des Fläschchens hinaus. Auch in diesem Falle ist die Anwendung eines Glaskügelchens notwendig.

Die Füllung mit Nährflüssigkeit kann bei diesem Fläschchen gleichfalls sehr leicht vorgenommen werden. Das Fläschchen mit Aufsatzrohr ist jedoch schwer zu sterilisieren, wenn dasselbe ganz gefüllt ist; eine der-

artige Sterilisation wird aber in der Praxis niemals vorkommen. Es ist — z. B. mit 25 ccm Laktosebouillon oder 5 ccm Eykman-Lösung gefüllt — im Autoklav leicht zu sterilisieren. Nach Abkühlung werden verschiedene Mengen zu prüfendes Wasser hinzugefügt, man füllt nötigenfalls mit sterilem Wasser nach und schließt zuletzt mit dem Aufsatzrohr ab[1]).

Ich möchte der Direktion der „N. V. Nederlandsche Gist- en Spiritusfabriek" in Delft, Holland, Dank sagen für ihre Genehmigung zur Veröffentlichung dieser Arbeit, insbesondere dem Herrn Direktor Ir. F. G. Waller für sein reges Interesse.

Zusammenfassung.

Es werden ein Gärröhrchen und ein Gärfläschchen für die Bestimmung gasförmiger Stoffwechselprodukte bei der Gärung von aeroben und anaeroben Mikroorganismen beschrieben, die gegenüber den üblichen Gärgefäßen einige wichtige Vorteile besitzen.

Über die Verwendung des Spongingerüstes von Meeresschwämmen bei bakteriologischen Arbeiten.

Von **Rudolf Bertel**, Wien.

Mit 1 Abbildung im Text.

Bei meinen Arbeiten über Meeresbakterien an der Küste von Monaco[2]) war ich bei Auffindung und Trennung der einzelnen am Stoffwechsel im Meere beteiligten Mikroben auf die Anwendung bestimmter elektiver Nährböden angewiesen. Denn nur mittels dieser konnten die chemischen Leistungen der einzelnen Bakterienformen erkannt und deren Zusammenwirken verständlich werden.

Die in der Literatur für die Anreicherung einzelner biologischer Gruppen angegebenen elektiven Nährböden in flüssiger Form anzuwenden, hatte viele Mißstände und führte besonders bei den sauerstoffliebenden Formen zu keinem Ziel. Deswegen suchte ich nach einem geeigneten festen Substrat zur Darbietung jener elektiven Nährlösungen.

Agar schien mir von vornherein ungeeignet, weil er ja selbst für viele Formen einen (bezüglich Zusammensetzung schwer kontrollierbaren) Nährstoff bildet, also das Bild der Nährstoffbilanz bzw. des Stoffwechsels stört.

Ebenso unbrauchbar erwiesen sich die vielfach empfohlenen Gips- oder Magnesia-Gips-Platten, die man mit den betreffenden elektiven Nährlösungen durchtränken soll. Das Kalziumsulfat wirkt auf viele Bakterienarten geradezu entwicklungshemmend und macht sich auch dadurch unangenehm bemerkbar, daß beim Herstellen mikroskopischer Präparate kleine Partikel vom Gips mit dem Bakterienmaterial an die Impfnadel kommen und bei vielen Färbungen störend wirken.

---

[1]) Die „N. V. Vereenigde Instrumenthandel voorheen G. B. Salm en P. J. Kipp & Zonen, Keizersgracht 642 in Amsterdam" hat diese Gärröhrchen und Gärfläschchen angefertigt und bringt dieselben auch in den Handel nach dem von uns angegebenen Modell.

[2]) Bertel, R., Les bactéries marines et leur influence sur la circulation de la matière dans la mer. (Bull. Inst. Océanogr. Nr. 672. 1935.)

Auch das bekannte Kieselsäuregel oder die Tonplatten u. dgl. entsprachen (ganz abgesehen von ihrer fraglichen Reinheit bezüglich der Zusammensetzung) nicht meinen Anforderungen.

Das für die oben angegebenen Zwecke geeignete chemisch indifferente Substrat fand sich nun in dem Spongingerüst der Hornschwämme (Ceraospongien); sowohl der Badeschwamm als auch der Pferdeschwamm lassen sich mit ihrem elastischen gleichmäßig starken Spongingerüst für den vorliegenden Zweck verwenden. Feinporige Arten, z. B. Levantinerschwämme, sind natürlich besonders gut geeignet.

Das genannte Spongingerüst bietet besonders folgende Vorteile:

1. Das Material ist überall leicht zu beschaffen und ist sehr billig, um so mehr, als man auch Abfälle und kleinste Stückchen verwenden kann. Überdies lassen sich die Stückchen nach dem Auskochen, Waschen und Sterilisieren mehrmals verwenden.

2. Das Substrat kann als chemisch indifferent bezeichnet werden, da es mit den Bodenbestandteilen der aufzusaugenden Nährflüssigkeiten keinerlei Verbindungen eingeht und durch die gezüchteten Mikroben keine Zersetzung erleidet[1]).

3. Infolge der Porosität und Kapillarität des Gerüstes bietet das Substrat eine enorme Oberfläche, die einen ausgiebigen Kontakt der Organismen mit dem Sauerstoff der Luft ermöglicht; dies ist besonders bei aerophilen Mikroben (Leuchtbakterien! u. dgl.) von Wichtigkeit.

4. Bei der Zucht von Schimmelpilzen erreicht man auf diesem Substrat ein gut entwickeltes Luftmyzel, das weder an Austrocknung, noch an Überfeuchtung zugrunde geht und gute Sporulierung aufweist. Das ganze Myzel bleibt dauernd gut durchlüftet und kann jederzeit durch Zuträufeln von Nährflüssigkeit zum Weiterwachsen angeregt werden.

5. Für säurebildende Organismen läßt sich auf dem Spongingerüst die zur Neutralisation der gebildeten Säure bestimmte Kreide gleichmäßig und feinst verteilen, so daß die Mikroben an keiner Stelle des Nährsubstrates durch Übersäuerung desselben benachteiligt erscheinen. In den gebräuchlichen flüssigen Nährböden sedimentiert die Kreide und es kommt nur die Oberfläche dieses Sedimentes mit den unmittelbar darüber gelegenen Teilen der Nährflüssigkeit in Berührung, wenn man nicht mehrmals am Tage durchschüttelt oder ein Aufwirbeln der Kreide durch Hindurchblasen von steriler Luft bewerkstelligt.

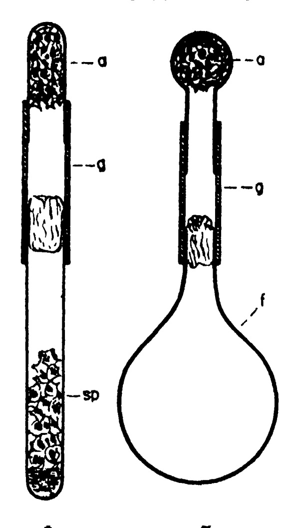
6. Gegenüber Kartoffelnährböden oder Brotnährböden zeigen die Sponginnährböden den großen Vorteil, daß sie gleichmäßig durchfeuchtet bleiben und nicht wie jene an den oberen Enden eintrocknen oder nach einigen Wochen zu einer formlosen Masse in sich zusammensinken!

7. Die Sponginnährböden eignen sich auch vorzüglich zur Herstellung von Dauerkulturen, indem man die aufgeimpften Bakterien, Hefen oder Schimmelpilze entweder langsam durch Abdunstenlassen des Wassers oder im Vakuum an den Sponginfäden eintrocknen läßt. Während eingetrocknete Gelatine- oder Agarkulturen mit ihrer dem festen Tischlerleim ähnelnden Konsistenz ein Auffrischen oder Regenerieren der Organismen meistens nicht mehr gestatten, genügt bei den von luftigen Kanälen durchsetzten Sponginkulturen der Zusatz von etwas sterilem Wasser oder steriler Nährlösung, um die eingetrockneten Organismen zu beleben.

---

[1]) Die Suche nach den sponginzersetzenden Bakterien ist auch Gegenstand meiner Studien in Monaco; bisher konnte ich solche Formen noch nicht feststellen.

8. Besonders vielfältig ist die Verwendung des Spongingerüstes bei der Cultivierung anaerober Organismen: Nachdem man den Agar- oder den Sponginnährboden (sp in Abb. 1) mit dem betreffenden anaeroben Organismus beimpft hat, stülpt man über das mit dem Wattepfropfen in normaler Weise geschlossene Kulturröhrchen mittels eines kurzen Gummischlauches (g) die sehr einfache Sauerstoffabsorptions-Vorrichtung. Diese besteht (a in Abb. 1 und 2) aus einem kurzen (alten, abgeschnittenen) Kulturröhrchen oder einem kugelig erweiterten Röhrchen, auf dessen Grunde ein Stückchen Spongingerüst eingelegt wurde. Letzteres wird unmittelbar vor dem Schließen der Apparatur mit 1 ccm 44proz. Lösung von Pyrogallussäure und 1 ccm 20proz. Kalilauge beträufelt. Die enorm große Sauerstoffabsorbierende Oberfläche des Sponginstückchens ermöglicht ein ungemein rasches Verschwinden des Sauerstoffs innerhalb des Kulturröhrchens, und daher ein rasches Wachstum des beimpften anaeroben Organismus. Will man nun von letzterem Proben zur Untersuchung oder zur Weiterimpfung entnehmen, so verschließt man mittels eines Quetschhahnes den Verbindungsschlauch, damit beim Abnehmen des Aufsatzes das darin befindliche Pyrogallol vor eindringender Luft bewahrt bleibt. Nach Beendigung der Untersuchung wird der kleine Aufsatz wieder mittels des Schlauches auf dem Kulturröhrchen befestigt und der Quetschhahn entfernt.



Wenn man den anaeroben Organismus in Plattenkultur zu züchten wünscht, so verwende man die flachen Soyka-Fläschchen (f) mit zylindrischem Hals (die vom Bakteriologischen Laboratorium, Prof. Pribram, Wien, IX, Michelbeuerngasse 1 a, bezogen werden können) und setze auf das mit Watte verschlossene Fläschchen den Absorptionsaufsatz (Abb. 2).

Statt der Pyrogallol-Methode läßt sich zur Entfernung des Sauerstoffs auch das seinerzeit von Tempé [1]) angegebene biologische Verfahren anwenden. Nur benötigt man bei Verwendung von Spongingerüst keinerlei Spezial-Kulturschalen. Man impft auf das im Aufsatzröhrchen enthaltene Sponginstückchen nach Tränkung mit einer entsprechenden Nährlösung einen sehr sauerstoffhungrigen Organismus, z. B. Serratia marcescens (Bacterium prodigiosum), und bringt ihn, nachdem man Kulturröhrchen und Absorptionsaufsatz mittels Schlauch verbunden hat, bei einer Temperatur von 20° C zu kräftiger Entwicklung. Nachdem dieser aerophile Organismus den ganzen Sauerstoff verbraucht hat, kommt der im Kulturröhrchen geimpfte anaerobe Organismus zur Entwicklung.

9. Sehr geeignet sind Sponginnährböden zur Kultivierung der Hefen, von denen man in der oben angegebenen Weise sehr brauchbare Dauerkulturen herstellen kann, die sich bequem versenden und leicht regenerieren lassen.

10. Bei allen oxydativen Gärungen (Essigsäure-, Milchsäure-, Zitronensäuregärung) kann man das Spongingerüst teils als luftreiches Substrat,

[1]) Tempé, Technique simple de culture en surface des microbes anaérobies. (C. R. Soc. Biol. T. 107. 1931. p. 1021.)

teils als Substrat für die zur Neutralisation der entstehenden Säuren bestimmten Stoffe, teils als regenerierbaren Füllkörper oder Rieselkörper verwenden.

Auch Algen (Grünalgen, Blaualgen und Diatomeen), ferner Rhizopoden und Myxomyceten habe ich mit Erfolg kultiviert.

Nur nebenbei möchte ich noch erwähnen, daß ich zur Herstellung von Luftfiltern nicht mehr Watte, sondern kleine, mit Glyzerin getränkte Sponginstückchen verwende. Diese werden in der kugelförmigen Erweiterung eines Glasröhrchens untergebracht und letzteres mittels eines kurzen Schlauches an der betreffenden Apparatur befestigt. Auch im technischen Betriebe kann man solche Sponginluftfilter (natürlich entsprechend modifiziert) in die zur Durchlüftung der Reinzuchten und gärenden Maischen dienenden Luftleitungen einsetzen.

Damit ist die Verwendbarkeit des hier besprochenen Hilfsmittels für die mikrobiologische Technik noch lange nicht erschöpft; die Laboratoriumspraxis wird die hier angeführten Beispiele gewiß noch vermehren.

Zusammenfassung.

Es wird über die vielseitige Verwendung des Spongingerüstes von Meeresschwämmen bei Züchtung aerober und anaerober Mikroorganismen berichtet.

Referate.

Bücher, Institutsberichte usw.

Abderhalden, E., Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden. Abt. XII: Methoden zur Erforschung der Leistungen von einzelligen Lebewesen. Teil 2, Heft 6, Lieferung 450, 154 S. Wien, Berlin (Verlag Urban & Schwarzenberg) 1936. Preis brosch. 8,40 RM.

J. Demeter behandelt auf 117 S. „Neue Methoden zur mikrobiologischen Untersuchung von Boden“, wobei vorwiegend die in den letzten 8 Jahren neu herausgebrachten Verfahren geschildert werden, so daß dieser Beitrag gewissermaßen als Fortsetzung der im Jahre 1927 in dem gleichen Handbuch (Abt. XI, Teil 3, Heft 5) erschienenen „Methoden der mikrobiologischen Bodenforschung“ von S. A. Waksman angesehen werden kann.

Die Stoffeinteilung ist folgende: I. Methoden zur Bestimmung des allgemeinen Keimgehaltes von Boden (qualitative und quantitative Untersuchungen); II. Methoden zur Bestimmung spezifischer Organismen bzw. Organismengruppen (wie Säure- und Alkalibildner, Gasbildner, Eiweißzersetzer, stickstoffbindende Bakterien, Aktinomyceten, Pilze, Hefen, Algen, Protozoen); III. Untersuchung der mikrobiologischen Umsetzungen einschließlich der hierbei tätigen Mikroorganismen (Kohlenstoff-, Stickstoff-, Schwefel- und Phosphorumsatz); IV. Verschiedenes (Bestimmung der Diffusionsgeschwindigkeit von Protozoen und Bakterien im Boden, Messung des Potentialgefälles zwischen Pflanze und Boden); V. Biologische Methoden zur Bestimmung der Düngebedürftigkeit von Boden (Bestimmung der Kalk-, Phosphor-, Kali- und Magnesiabedürftigkeit).

Die Bearbeitung ist mit Umsicht und guter Sachkenntnis erfolgt, der Text ist klar und verständlich.

Auf 14 S. hat **N. Cholodny** die „Methoden zur Kultur der Eisenbakterien" dargelegt, wobei er einleitend darauf hinweist, daß Reinkultur-Methoden für diese Organismengruppe bisher fast gar nicht ausgearbeitet seien. Er beginnt deshalb mit der Gewinnung von Rohkulturen der Eisenbakterien, beschreibt u. a. seine Deckglas-Methode, die von Winogradsky angewandte Methode der Tropfenkultur, die Methoden des künstlichen Sumpfes und der künstlichen Eisenquelle nach Winogradsky, Kultur der Gallionella ferruginea nach Lieske, Suessenguth und Adler usw.

Von Reinkulturverfahren werden u. a. die für Leptothrix crassa nach Molisch und nach Lieske beschrieben. Den Schluß bildet der Abschnitt „Kultur der Eisenbakterien im Boden". Die neueste Arbeit von Dorff (vgl. Referat dieser Zeitschrift, Bd. 94, S. 175) findet hier noch keine Erwähnung.

Von **E. Jahn** stammen die beiden letzten Beiträge „Kulturmethoden und Stoffwechseluntersuchungen bei Myxomyzeten (Schleimpilzen) (15 S.) u. desgl. bei „Myxobakterien (Polyangiden)" (5 S.). Im ersteren wird nach einer kurzen Einleitung mit Hinweis auf den Entwicklungsgang in der haploiden und diploiden Phase die Zucht auf dem Objektträger und auf Agar beschrieben, dann die Keimung der Sporen, der Schwärmer, ihre Kopulation und schließlich ihre großen Plasmodien. Im zweiten Beitrag gibt Verf. zunächst eine Definition der Myxobakterien und kommt dann auf die Rohkulturen und Reinzüchtung sowie auf den Stoffwechsel, soweit überhaupt Untersuchungen darüber vorhanden sind, zu sprechen. Sehr viele Angaben des Verf.s stützen sich hierbei auf langjährige eigene Erfahrungen. Stapp.

Gmelins Handbuch der anorganischen Chemie. 8. Aufl. Syst. No. 4: Stickstoff. Lieferung 3, 348 S. Herausgeg. von der Dtsch. Chem. Ges. Berlin (Verlag Chemie) 1935. Preis brosch. 55,— RM.

Die vorliegende 3. Lieferung, an der 13 Sachbearbeiter beteiligt sind, behandelt den Stickstoff in Verbindung mit Sauerstoff, und zwar das Distickstoffoxyd N_2O, Stickstoffoxydul NO, Distickstofftrioxyd N_2O_3, Stickstoffdioxydul NO_2 (Distickstofftetroxyd N_2O_4), Distickstoffpentoxyd N_2O_5 und das Stickstofftrioxyd NO_3 (Distickstoffhexoxyd N_2O_6). Von diesen Stickstoffoxyden wird in ausführlicher Weise Geschichtliches, Bildung, Zerfall, Darstellung, physikalische Eigenschaften, chemisches Verhalten, Nachweis und Bestimmung erläutert. Mit der „Analyse der Stickstoffoxyde" schließt dieses seinen Vorgängern nicht nachstehende Heft ab. Stapp.

v. Schelhorn, M., Zur Ökologie und Biologie der Erdalgen. Heft 18 der Sammlung „Naturwissenschaft und Landwirtschaft". Herausgeber F. Boas. 54 S.; mit 11 Abb. Freising-München (Verlag Dr. F. P. Datterer & Co.) 1936. Preis 2,60 RM.

Seit kurzem findet ein bisher recht vernachlässigtes, aber wichtiges Teilgebiet der Bodenmikrobiologie in der Wissenschaft wieder mehr Beachtung, es ist das die Erdalgenforschung. Verf. hatte es sich zur Aufgabe gemacht, den Zusammenhang zwischen der Bodenreaktion und der Algenflora zu klären und berichtet in der vorliegenden Veröffentlichung über seine Ergebnisse.

Wie vorauszusehen war, zeigt die Artenzahl und -menge je nach der Verschiedenheit der Reaktion große Unterschiede. Es werden 2 Gruppen

von Erdalgen einander gegenübergestellt; die 1. Gruppe umfaßt ziemlich anspruchslose Gattungen und Arten, deren regelmäßiges Vorhandensein nicht viel besagt, während ihr Fehlen nach Verf. wichtige Schlüsse erlauben kann. Die 2. Gruppe stellt „Spezialisten" dar, deren Vorhandensein bestimmte Verhältnisse anzeigt. So gibt es Arten, die nur in sauren, und solche, die nur in neutralen bis alkalischen Böden zu finden sind. Anderseits soll z. B. das Vorkommen von Desmidiaceen das Fehlen von $CaCO_3$ im Boden, Reichtum an Diatomeen die Anwesenheit von Ammoniumphosphat und -sulfat im Boden anzeigen.

Obwohl hier nur der eine Faktor, die Reaktion, etwas eingehender untersucht ist, glaubt Verf. doch bereits sagen zu können, daß die Bodenalgenforschung als Methode zur Beurteilung eines Bodens auf seinen Kulturwert große praktische Bedeutung bekommt, da aus der Algenflora eines Bodens eine Reihe wichtiger Schlüsse auf seine chemischen und physikalischen Eigenschaften und seine Güte und Kulturfähigkeit gezogen werden können.

Stapp.

Hueck, K., Die Pflanzenwelt der deutschen Heimat und der angrenzenden Gebiete. Lieferung 71—80. Berlin-Lichterfelde (Hugo Bermühler-Verlag) 1936. Preis je Liefg. 3,— RM.

Diese weitere Folge von Lieferungen des ausgezeichneten Werkes (siehe Besprechung der vorletzten Lieferungen, diese Zeitschrift, Bd. 93. 1935/36. S. 141/142) enthält die Fortsetzung des Kapitels „Die Steppenheiden", und zwar das Vorkommen der Steppenheide in Mittel- und Süddeutschland, die Pflanzengesellschaften der Steppenheiden (Moos- und Flechtengesellschaften, andere Pioniergesellschaften, das Xerobrometum, das Mesobrometum u. a. Rasengesellschaften, Strauch- und Waldgesellschaften) und die Lebensbedingungen dieser Pflanzenassoziationen.

Der nächste Abschnitt umfaßt „Die alpine Vegetation" mit ausführlichen Angaben über die Baumgrenze und ihre Ursachen sowie die Temperatureinflüsse auf die Pflanzenwelt, die kurze Vegetationsdauer, die Wirkung des Schneeschutzes und die Schädigungen durch die Schneedecke, den Einfluß des Windes usw., die Arve und die Lärche an der Baumgrenze und den Knieholzgürtel.

Die Klarheit des Textes und die durchweg hervorragenden Bildbeigaben verdienen immer wieder besonders lobend hervorgehoben zu werden.

Stapp.

Oppenheimer, C. und Pincussen, L., Tabulae Biologicae Periodicae. Bd. V, No. 3, 96 S. Den Haag (Verlag Dr. W. Junk) 1935. Bandpreis 55,— RM.

Dieses neueste Heft enthält 3 Beiträge: Formicidae II von H. Stitz, Pflanzliche Chromosomen-Zahlen III von G. Tischler und die Carbohydrasen von W. Roman.

Wer sich z. B. schnell und zuverlässig über die biologischen Daten der Formiciden, über die Chromosomenzahlen von Pilzen oder die Oligasen von Bakterien und Pilzen orientieren will, wird stets zu diesem Band der „Tabulae Biologicae Periodicae" greifen müssen. Stapp.

Rojahn, C. A., Jahresbericht über die Fortschritte in der Untersuchung der Nahrungs- und Genußmittel sowie Gebrauchsgegenstände. 44. Jahrg. 1934. 442 S. Göttingen (Vandenhoeck & Ruprecht) 1935. Brosch. 8.— RM.

In referierendem Stil bringt der Bericht die Fortschritte auf den zahlreichen Gebieten der Nahrungs- und Genußmitteluntersuchung. Von den mikrobiologischen Themen seien nur einige herausgegriffen wie: Zerstörung von Bakterien in Milch durch ultraviolettes Licht, Milchsäurebakterien als rote Adern im Gouda-Käse, Penicillium brevicaule var. album (der sog. Arsenschimmel), Erkrankung durch Genuß roher Enteneier (Enteritisbakterien), Isolierung von Muskarin aus dem ziegelroten Rißpilz Inocybe lateraria Ricken, bakteriologische Grundlagen über die Herstellung von Fleischkonserven u. a. m.

Von den Prüfungsmethoden für Gebrauchsgegenstände nehmen die Kraftfahrstoffe, ihrer steigenden Bedeutung angemessen, größeren Raum ein. Zahlreiche neue Bestimmungsmethoden für Benzingemische sind entstanden. Das wichtige Gebiet über die Wirkung von Kampfstoffen auf Nahrungsmittel und Wasser wird mit einigen Daten gestreift. Für den Mediziner und Pharmakologen dürften besonders die im letzten Abschnitt beschriebenen Untersuchungs-Ergebnisse der toxikologischen und forensischen Chemie von Bedeutung sein.

Der Bericht schließt mit einer Zusammenstellung der einschlägigen Gesetze und Verordnungen nebst Literaturverzeichnis.

Bärner (Berlin-Dahlem).

Allgemeines und Methodisches.

Durchführung biologischer Prozesse mit Hilfe deckenbildender Gärungserreger. Dipl.-Ing. Wilhelm Klapproth, Nieder-Ingelheim a. Rh. DRP. 622 070, Kl. 6 a.

Man ordnet zwischen Luft und Nährlösung Membranen an, die ganz oder teilweise aus Stoffen bestehen, die zum Aufbau der Pilzdecken dienen. Die Membranen können z. B. aus Pergamentpapier bestehen. Sie bieten bei einer neuen Gärung die unbedingte Gewähr der Abwesenheit störender Keime aus der alten Gärung.

Schütz (Berlin).

Hruzsek, H., Versuche über eine „biologische" Nährbodenzubereitung für Bakterien. (Klin. Wochenschr. Jahrg. 14. 1935. S. 1855—1857.)

Flüssige Nährböden sind durch Beimpfung mit bestimmten Keimen nach einer bestimmten Richtung hin modifizierbar. Es läßt sich je nach dem verwandten Stamm ein verbesserter oder verschlechterter Nährboden gewinnen, der in bezug auf seine Eignung nach Zugabe von Agar und Beimpfung durch Ausstrich geprüft werden kann. Diese Art von Nährbodenzubereitung wird als „biologische" bezeichnet, da sie in der ersten Etappe (als flüssiger Nährboden) durch einen Wachstumsvorgang von Keimen erreicht wird. Die zweite Etappe dieser Nährbodenzubereitung besteht aus Inaktivierung, Agarzugabe und Sterilisierung. Verf. verwandte als Ausgangsmedium Preßsaft von Zwiebeln, Gurken usw. Auf dem biologischen Nährboden wurde öfter Farbstoffbildung beobachtet, die auf den Kontrollplatten ausblieb.

Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Bausch, H., Vierkantreagensgläser für Komparatoren. (Wochenschr. f. Brauerei. Bd. 52. 1935. S. 397.)

Der kreisförmige Querschnitt der bisherigen Komparatorgläser hat zur Folge, daß die Schichtdicke der zu vergleichenden Flüssigkeiten beim Durchblick durch den Komparatorblock von der Mittellinie des Gesichtsfeldes nach den Seiten zu immer geringer wird, was die Farbtiefe beeinflußt. Gläser

mit quadratischem Querschnitt liefern ein vergrößertes Gesichtsfeld mit unveränderter Schichtdicke und ermöglichen größere Genauigkeit der Messungen.

Heuß (Berlin).

Pesch, K. L., Über eine neue Methode der Desinfektionsmittelprüfung. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. I., Orig. Bd. 135. 1935. S. 197—200.)

Die Desinfektionsmittelprüfung nach der Suspensions-, Glasperlen- oder Stoffläppchen-Methode liefert viel zu niedrige Werte, wenn es gilt, Keime im biologischen Medium (auf Wänden, Möbeln, stark infizierten Instrumenten, Schleimhäuten usw.) zur Abtötung zu bringen. Für diese Zwecke hat Verf. als Keimträger gelbe, keimfähige Erbsen als besonders geeignet gefunden. Diese neue Keimträger-Methode wird folgendermaßen durchgeführt: 10 gleich große Erbsen werden in ein 3 × 5 cm großes (Sputumversand-) Gefäß mit einem aus dünner Aluminiumfolie hergestellten, ziemlich weit nach unten reichenden, leicht abhebbaren Überfalldeckel gegeben und im Autoklav bei 0,5 at. 35 Min. lang sterilisiert. Auf die trockenen, sterilen Erbsen werden dann 10 ccm sterile Bouillon gegeben, und diese wird mit einer Normalöse einer 48stünd., gut durchgeschüttelten Bouillonkultur des zu prüfenden Keimes beimpft. Nach 48stünd. Bebrütung dieser Erbsenbouillonkultur wird die Bouillon steril abpipettiert und durch die gleiche Menge des zu prüfenden Desinfektionsmittels in der gewünschten Konzentration ersetzt. Nach verschiedenen Zeiten (1, 3, 5, 10, 30 Min., 1, 3, 5, 7, 24 Std.) wird je eine Erbse mit steriler Pinzette herausgenommen, mit steriler NaCl-Lösung abgespült und in ein Röhrchen mit 0,1proz. Traubenzuckerbouillon gegeben. Nach 3tägiger Bebrütung Abimpfung auf optimale Nährböden (5proz. Hammelblut-Agar, 0,1proz. Traubenzucker-Agar je nach Art der geprüften Keime). Ablesen der Ergebnisse nach 3tägiger Bebrütung.

Die vom Verf. mit verschiedenen Keimarten, verschiedenen Konzentrationen und verschiedenen Desinfektionszeiten durchgeführten Versuche gaben alle übereinstimmend eine absolut scharfe Grenze der Desinfektionsmittelwirkung, was die Brauchbarkeit der Methode beweist.

Von den geprüften Präparaten erwiesen sich Sagroten und Baktol am wirksamsten. In den meisten Versuchen war zwar Sagroten dem Baktol in der Wirkung etwas überlegen, gelegentlich erwies sich aber auch Baktol als das bessere Desinfektionsmittel. In der Reihe der Wirksamkeit folgten dann: Valvanol, Chlor-Kresol-Chlor-Xylenol, Kresolseifenlösung und Phenol. Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Morphologie, Physiologie und Systematik der Mikroorganismen; Virus-Untersuchungen.

Milovidov, P. F., Ergebnisse der Nuclealfärbung bei den Myxobakterien und einigen anderen Bakterien. (Archiv f. Mikrobiologie. Bd. 6. 1935. S. 475—509.)

In den Mikrocysten von Myxococcus virescens findet sich, augenscheinlich in den Hüllen, ein aldehydähnlicher Stoff, der ohne Hydrolyse die Feulgensche Reaktion ergibt; in den vegetativen Stäbchen tritt eine Reaktion nur nach Hydrolyse ein; die nuclealpositive Substanz ist wahrscheinlich in Stäbchen und Körnchen, die den größten Teil der Zelle einnehmen, lokalisiert, die wahrscheinlich identisch sind mit den mit anderen Färbmethoden festgestellten Chromatinkörperchen: außer der obengenannten Form wurde noch Polyangium fuscum untersucht.

Bei Bakterien (B. mycoides, megaterium, anthracis, subtilis, Knöllchenbakterien, Sarcina lutea) geben jugendliche Stadien eine schwache, diffuse Nuclealreaktion. Bei Beginn der Sporenbildung differenziert sich der nuclealpositive Stoff in 1—2, meist an den Polen liegende Körnchen; in den Sporen findet sich ein peripher gelagertes halbmondförmiges Körperchen. Jedenfalls enthalten die Bakterien danach keinen echten Zellkern.

Die Feulgen-Reaktion tritt bei allen Objekten nach einer Hydro-

lysedauer von 3—4 Min. auf und verschwindet nach einer Hydrolysedauer, die länger ist als 20 Min. Rippel (Göttingen).

Schopfer, W. H., Vitamines et facteurs de croissance chez les plantes. Contribution à l'étude quantitative des conditions d'action des facteurs de croissance sur Phycomyces. (Archiv f. Mikrobiologie. Vol. 6. 1935. p. 510—531.)

Verf. untersuchte die quantitative Wirkung von Vitamin B 1 auf Phycomyces blakesleeanus bei Zuckerüberschuß, aber variierter Asparagin-Menge. Für die gewählten Versuchsbedingungen (Glukose 10%, Asparagin 0,005—0,4%, $MgSO_4$ 0,05%, KH_2PO_4 0,15%, pH 4,5, 25 ccm Nährlösung in 150 er Erlenmeyer, Sterilisation 15 Min. bei 115° C) ergab sich: Bei konstanter Vitamin-Gabe bestimmt die Menge des Asparagins die Höhe der Ernte. Bei Variieren der Asparagin- und der Vitaminmenge liegt für die höhere Asparagin-Gabe das Erntemaximum bei höheren Vitaminmengen. Um 1 mg Mycel zu erzeugen, ist eine konstante Vitaminmenge notwendig, nämlich rund 5 mγ.

Diese Größe wird vom Verf. als Phycomyces-Einheit bezeichnet (U. P., unité Phycomyces). Rippel (Göttingen).

Edlich, F., Einwirkung von Temperatur und Wasser auf aerophile Algen. (Archiv f. Mikrobiologie. Bd. 7. 1936. S. 62—109.)

Bei der geringen Zahl echter Epiphyten in unseren Breiten beanspruchen die Algen auf Baumstämmen besonderes Interesse. Untersucht werden, am natürlichen Standort und in Kultur, Pleurococcus vulgaris Menegh., Apotococcus minor Edl. (außer dieser Art wird noch A. perspicuus Edl. unterschieden als Aufteilung von A. vulgaris Br.) und Stichococcus bacillaris Naeg. Die erstgenannte Alge findet sich ganz nahe am Boden, höchstens bis zu ½ m aufsteigend, darüber Ap., während St. sich an verschiedenen Standorten findet, aber stets bei großer Feuchtigkeit und nicht zu hoher Lichtintensität. Die Morphologie der Algen wird behandelt, besonders eingehend die von Apotococcus.

Die Hauptuntersuchung betrifft die Ökologie, von der Beobachtung ausgehend, daß die Algenlager in der Natur vielfach einen oft hohen Prozentsatz toter Zellen enthalten. Die Hitzeresistenz ist von der relativen Luftfeuchtigkeit abhängig, mit deren Steigen sie sinkt. Bei höheren Temperaturen, 45—60° C, ist, unabhängig von der Luftfeuchtigkeit, Pl. am ausdauerndsten, am wenigstens Ap. Bei 30—40° C ist dagegen Ap. am widerstandsfähigsten, außer bei hoher Luftfeuchtigkeit. Die Temperaturen auf der Baumborke am natürlichen Standort können für die Algen tödlich sein; im Höchstfalle wurden 49,7° C gemessen.

Gegen Kälte ist besonders Pl. widerstandsfähig und verträgt 80° C Kälte mindestens 24—26 Std. lang, die beiden anderen nur 1—2 Std., bei Vorbehandlung in Luft von 100% relativer Dampfspannung. Vorbehandlung in trocknerer Luft erhöht die Kältewiderstandsfähigkeit beträchtlich.

Unterhalb 90—95% relativer Dampfspannung findet kein Wachstum von St. mehr statt, bei Pl. ist 85—90%, bei Ap. etwa 70% die Grenze. St. wächst bei 100% relativer Dampfspannung am besten, Pl. bei 97—98%, Ap. stirbt bei längerer Einwirkung hoher Luftfeuchtigkeit ab, wächst auch nur gut bei ständigem Wechsel zwischen höherer und niederer Luftfeuchtigkeit. Dauernd nasses Wetter im Freien schädigt daher Ap., während es auf St. äußerst günstig wirkt.

St. und Pl. werden durch gewisse Zeit dauernde Insolation, im Gegensatz zu Ap., geschädigt.

In der Natur finden sich stets Pilze mit den Algen zusammen. Bei künstlicher Züchtung zeigen auch pilzfreie Kulturen viel schlechteres Wachstum als pilzführende.

Viele weitere Einzelheiten (z. B. auch Wasseraufnahme und -abgabe usw.) sind aus dem inhaltsreichen Original zu ersehen. Rippel (Göttingen).

Uspensky, E. E., Transformation of certain hereditary forms into other ones and the arising of new forms in the genus Spirogyra. (Microbiology. Vol. 3. p. 437—469.) [Russ. m. engl. Zusfassg.]

Eine bei den niederen Pflanzen zweifellos weit verbreitete Erscheinung ist die Umwandlung einer erblich festgelegten Form in eine andere, deren Zelldicke $\sqrt[3]{2}$ mal größer ist als die der nächst kleineren Form. Verbunden damit sind Abänderungen anderer morphologischer sowie physiologischer Eigenschaften. Derartige Beziehungen, die übrigens auch bei Bakterien beobachtet werden konnten, wurden hier bei Spirogyra einer eingehenden Untersuchung unterzogen. Alle Formen von Spirogyra, deren Zelldicken sich um den Faktor $\sqrt[3]{2}$ voneinander unterscheiden, wurden von Verf. in Reihen zusammengestellt, die er „species conjunctae" nennt.

Bortels (Berlin-Dahlem).

Schädigungen der Pflanzen durch Pilze, Bakterien und filtrierbare Vira.

Holton, C. S., Studies of seven differentiating characteristics of two physiologic forms of Tilletia tritici. (Phytop. Vol. 25. 1935. p. 1091—1098, 3 figs.)

Verf. stellte fest, daß sich zwei physiologische Formen von Tilletia tritici auf der Weizensorte Hohenheimer in bezug auf Größe der Spore, Länge des Promyzels und Kernverteilung bei der Sporenkeimung verschieden verhielten. Er hatte früher schon beobachtet, daß die Pathogenität der beiden Formen, die Größe und Form der Brandbutten, die Erhebungen auf den Sporenwänden und die Art der Keimung verschieden waren. Auf der Sorte Hussar riefen die beiden Formen eine verschieden starke Beeinträchtigung des Wachstums der Wirtspflanze hervor.

Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Kheswalla, K. F., Seedling blight of Cinchona ledgeriana Moens caused by Phytophthora palmivora Butl. in the Darjeeling district. (Indian Journ. of Agric. Sc. Vol. 5. 1935. H. 4. p. 485—495, 1 Taf.)

In Sikkim wurde von Cinchona-Kulturen, die an Sämlingsbräune erkrankten, eine Phytophthora isoliert. Vergleichsuntersuchungen mit anderen Phytophthora-Arten ließen eine große Ähnlichkeit mit P. palmivora erkennen. Es wird angenommen, daß es sich bei der Cinchona-Phytophthora um einen Stamm von P. palmivora handelt. Sporenmessungen ergaben Übereinstimmungen in der Länge, jedoch sind die Cinchona-Phytophthorasporen um weniges schmäler. Die optimale Wachstumstemperatur lag bei 24° C, während das Maximum bei 35° C zu suchen ist.

Bärner (Berlin-Dahlem).

Blodgett, E. C., The anthracnose of currant and gooseberry caused by Pseudopeziza ribis. (Phytop. Vol. 26. 1936. p. 115—152, 6 figs.)

Verf. stellte seine Untersuchungen über Pseudopeziza ribis mit Isolationen aus Wisconsin, Oregon, Kanada und einer Kultur aus Europa an. Die Isolationen unterschieden sich beträchtlich hinsichtlich ihrer morphologischen und physiologischen Eigenschaften. Sie waren sämtlich pathogen, wenn auch in verschiedenem Grade. Die optimale Temperatur für die Keimung der Konidien lag bei 20° C, die für die Keimung der Asko-

sporen bei 12° C und die für das Wachstum des Pilzes auf festem Nährboden bei 20° C. Bei 32° C wurden Sporen und Myzel in Kultur abgetötet. Konidien wurden am stärksten bei 20—24° C, Mikrokonidien bei 8—16° C gebildet. Askosporen wurden bei Temperaturen von 1—32° C ausgeschleudert. p_H 5,4—7 war für das Wachstum und die Keimung von Konidien am günstigsten. Sporen von Johannisbeeren waren bei Johannisbeeren stärker pathogen als an Stachelbeeren und umgekehrt. Infektionen auf der Blattunterseite infizierten stärker als solche auf der Oberseite. Pflanzen, die vor der Infektion bei höheren Temperaturen gehalten wurden, wurden stärker infiziert als solche, die kühl gehalten wurden. Verf. untersuchte auch das Eindringen des Pilzes in das Blatt. Primärinfektionen werden durch Askosporen, durch Konidien, die im Frühjahr und wahrscheinlich auch durch solche, die im Herbst gebildet werden, hervorgerufen. Das Perfektstadium auf Ribes grossularia konnte Verf. zum ersten Male nachweisen. An Hand von graphischen Darstellungen wird die Abhängigkeit des Erregers und der Krankheit von klimatischen Bedingungen gezeigt. Die beste Bekämpfung konnte mit Kupferkalkbrühe 3 : 4 : 50 erreicht werden. 1. Spritzung: kurz vor der Blüte; 2. sofort nach dem Fruchtansatz; 3. 3 Wochen später; 4. sofort nach der Ernte. Schwefelkalkbrühe 1 : 40 war zwar gegen die Anthraknose weniger wirksam, aber der amerikanische Stachelbeermehltau konnte mit dieser Brühe besser als mit Kupferkalkbrühe bekämpft werden. Verf. empfiehlt, die ersten beiden Spritzungen mit Schwefelkalk- und die weiteren mit Kupferkalkbrühe durchzuführen.

Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Venkatarayan, S. V., The biology of Ganoderma lucidum on areca and cocoanut palms. (Phytop. Vol. 26. 1936. p. 153—175, 6 figs.)

Ganoderma lucidum verursacht in Mysori und anderen Teilen von Indien eine Krankheit der Areka- und Kokospalme. Die Untersuchung der in dem Pilz vorhandenen Enzyme ergab, daß Diastase, Laccase, Invertase, Protease, Coagulase, Rennetase und Oxidase ausgeschieden werden, dagegen nicht: Maltase, Lipase und Katalase. Der Pilz wächst am besten bei p_H 6,5, ist aber in der Lage, bei p_H 3—7 zu wachsen. Auf der alkalischen Seite findet kein Wachstum statt. Nach den Versuchen des Verf.s scheint Ganoderma lucidum ein wenig aktiver Parasit zu sein.

Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Young, P. A., Sclerotinia rot of squash and pumpkin. (Phytop. Vol. 26. 1936. p. 184—190, 2 figs.)

Sclerotinia sclerotiorum verursacht eine Naßfäule an den Früchten von Cucurbita pepo und eine Trockenfäule an den Früchten von C. maxima. An den Früchten wird weißes Myzel und eine große Zahl von schwarzen Sklerotien gebildet. Diese Sklerotien bilden Apothezien, wenn sie in Sand gebracht werden. Als neue Wirtspflanzen in Montana werden angegeben: Chrysanthemum maximum, Lactuca sativa, Zinnia elegans, Melilotus officinalis, Melilotus alba, Pisum sativum, Phaseolus vulgaris, Solanum tuberosum, Daucus carota und Apium graveolens. Die bisher als Wirt festgestellten Pflanzen sind in einer Liste angegeben. Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Abgeschlossen am 5. August 1936.

Inhaltsverzeichnis.

I. Verzeichnis der in Band 94 enthaltenen Arbeiten.

II. Namen- und Sachverzeichnis.

(Stichworte, die auf Originalarbeiten hinweisen, sind durch ein * gekennzeichnet.)


Fürstl. priv. Hofbuchdruckerei (F. Mitzlaff) Rudolstadt